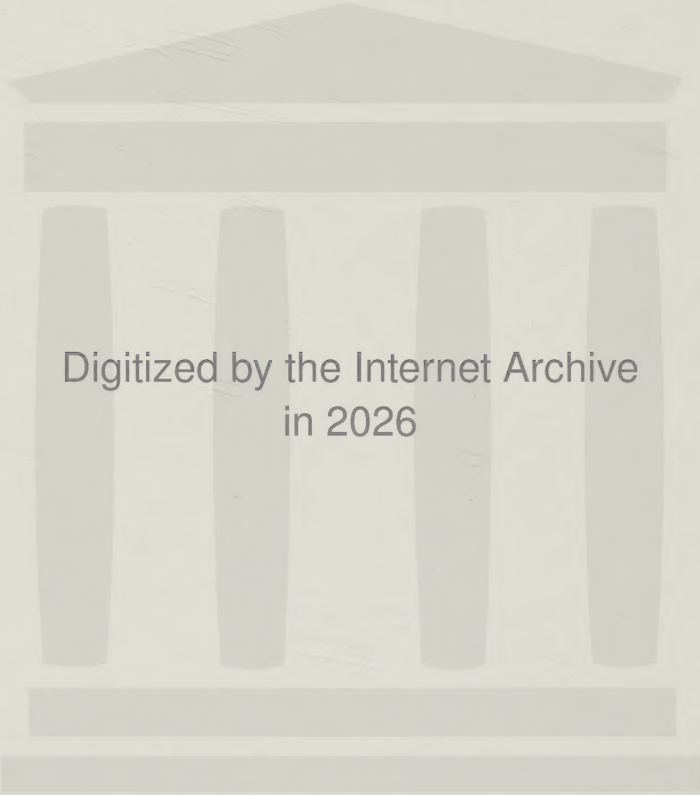


UNTERSUCHUNGEN ÜBER BINDUNGSSTELLEN FÜR
ADENOSINREZEPTORLIGANDEN IM RATTENHIRN

ANDREAS ERFURTH

1987

Disbui. München



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Max-Planck-Institut für Psychiatrie -
Abteilung Neuromorphologie
Vorstand: Prof. Dr. G. W. Kreutzberg

UNTERSUCHUNGEN ÜBER BINDUNGSSTELLEN FÜR
ADENOSINREZEPTORLIGANDEN IM RATTENHIRN

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität, zu München

vorgelegt von
Andreas Erfurth
aus Hamburg

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. P. Schubert

Mitberichterstatter: 1. Prof. Dr. P. Mehraein
2. Prof. Dr. H. Rabes

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. H. Reddington

Dekan: Prof. Dr. W. Gnaun

Tag der mündlichen Prüfung: 15.10.1987

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. G.W. Kreutzberg am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in Martinsried in der Zeit vom Januar 1984 bis April 1987 durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof. Kreutzberg für seine aufmerksame und großzügige Unterstützung.

Herrn Dr. M. Reddington danke ich für die stimulierende und kontinuierliche Beratung; seine tatkräftige Betreuung war ein wertvoller Rückhalt meiner Arbeit.

Herrn Dr. K.S. Lee, Herrn Dr. W. Tetzlaff und meinem Mitdoktoranden Herrn M. Graeber gilt mein Dank für punktuelle Hilfe und anregende Diskussion.

Für ihre erfahrene technische Hilfe danke ich Frau W. Komp, Frau B. Rieder, Frau U. Wallner und Frau P. Grämmel.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Neuromorphologie danke ich für die freundliche Unterstützung während meiner Zeit in Martinsried.

INHALTSÜBERSICHT

1. Einleitung
 - 1.1. Adenosin - Allgemeine Physiologie und Stoffwechsel
 - 1.2. Adenosin im Zentralnervensystem
 - 1.3. Adenosin und zentral wirksame Substanzen
 - 1.3.1. Adenosin und Benzodiazepine
 - 1.3.2. Adenosin und Neuroleptika
 - 1.3.3. Adenosin und Antidepressiva
 - 1.3.4. Adenosin und Barbiturate
 - 1.3.5. Adenosin und Morphin
 - 1.3.6. Adenosin und Alkohol
 - 1.4. Bindungsstellen für Adenosinrezeptorliganden
 - 1.5. Fragestellungen
 - 1.6. Anhang zur Einleitung
 - 1.6.1. Exkurs I : Methylxanthine
 - 1.6.2. Exkurs II : Das Lesch-Nyhan-Syndrom
 - 1.6.3. Exkurs III : Muskeldystrophie
2. Material und Methoden
 - 2.1. Reagenzien
 - 2.2. Bindungsexperimente mit quantitativer Autoradiographie
 - 2.2.1. Herstellung von Kryostatschnitten
 - 2.2.2. Durchführung der Bindungsversuche
 - 2.3. Herstellung von Standardschnitten
 - 2.4. Bindungsexperimente mit Membranfraktionen
 - 2.5. Bindungsexperimente mit Vorbehandlung durch N-Äthylmaleimid oder p-Chloromercuribenzoat

3. Ergebnisse
- 3.1. Bindung von [^3H]-Cyclohexyladenosin - Studien mit quantitativer Autoradiographie
- 3.2. Bindung von [^3H]-N-Äthylcarboxamidoadenosin
 - 3.2.1. Studien mit Membranfraktionen
 - 3.2.2. Studien mit quantitativer Autoradiographie
- 3.3. Bindung nach Vorbehandlung mit N-Äthylmaleimid oder p-Chloromercuribenzoat
 - 3.3.1. Studien mit Membranfraktionen
 - 3.3.2. Studien mit quantitativer Autoradiographie
4. Diskussion
5. Zusammenfassung
6. Schrifttumsverzeichnis

1. Einleitung

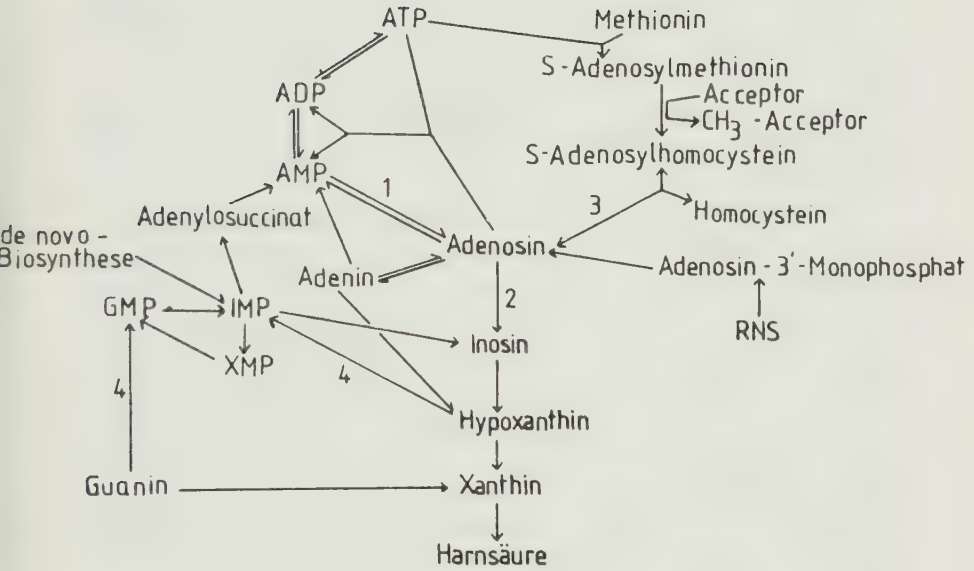
1.1. Adenosin - Allgemeine Physiologie und Stoffwechsel

Adenosin erfüllt im Körper eine Reihe unterschiedlicher biologischer Funktionen: es führt zu starker Vasodilatation ^{23,24} - in der Niere allerdings zu Vasokonstriktion ^{25,26} sowie Hemmung der Reninausschüttung ²⁷ -, wirkt am Herzen negativ chronotrop ^{28,29}, negativ dromotrop ³⁰ und negativ inotrop ³¹, führt zur Relaxation glatter Muskulatur ^{32,33} - jedoch zur Konstriktion der Trachea ³⁴ und der Bronchien bei Asthmatikern ³⁵ -, hemmt die Thrombocytenaggregation ³⁶, inhibiert die Funktion von Lymphocyten ³⁷, fördert die Histaminausschüttung aus Mastzellen ³⁸, hemmt die Lipolyse ³⁹, stimuliert die Steroidproduktion ⁴⁰ und fördert die Glukagonabgabe aus dem Pankreas ⁴¹. Im Gehirn vermittelt Adenosin eine wichtige hemmende Funktion, auf die in 1.2. näher eingegangen wird.

All diese Wirkungen können durch Theophyllin antagonisiert werden ⁴². Theophyllin gehört zu den Methylxanthinen (siehe auch 1.6.1.) und besitzt eine antagonistische Wirkung an Adenosinrezeptoren (siehe auch 1.4.).

Adenosin kann auf vielfältige Weise entstehen. Abb.1 (nach ^{43,44,45}) gibt einen Überblick über den Purinstoffwechsel. Im Gehirn entsteht das meiste Adenosin über die Dephosphorylierung von Adenosin-5'-Monophosphat (AMP), durch die 5'-Nukleotidase ⁴⁶ und über die Wirkung der S-Adenosylhomocysteinhydrolase auf das bei Methylgruppen-donation aus S-Adenosylmethionin entstehende S-Adenosylhomocystein ⁴⁷. (S-Adenosylmethionin ist einer der wichtigsten CH₃-Donatoren im Zellstoffwechsel ⁴⁸, es ermöglicht u.a. die Reaktion von N-Acetylserotonin zu Melatonin, von Noradrenalin zu Adrenalin sowie die Methylierung von Pharmaka.) Der Abbau des Adenosins geschieht durch die Adenosindeaminase, ein großer Teil des Adenosins wird

Abb. 1



- 1 5'- Nukleotidase
- 2 Adenosindeaminase
- 3 S-Adenosylhomocysteinhydrolase
- 4 HGPRT

allerdings wieder in Nukleotide eingebaut ^{7,9,121,122}. Die Synthese von S-Adenosylhomocystein aus Adenosin spielt dagegen keine wichtige Rolle im Zentralnervensystem ¹³⁰.

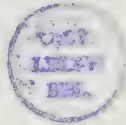
Aus Studien mit Vorinkubationen mit radioaktiv markiertem Adenosin ist bekannt, daß Adenosin rasch mittels eines Carriermechanismus in Zellen aufgenommen wird ¹²¹. Der Transport von Adenosin zeigt eine Sättigungskinetik in Analogie zur Michaelis-Menten-Kinetik. Bei Überschreiten eines Grenzwertes von etwa 10^{-6} M kann Adenosin wohl auch durch Diffusion in die Zelle gelangen ¹²². Der Aufnahme-Mechanismus kann durch einige Pharmaka gehemmt werden (Dipyridamol, Hexobendin, Papaverin), nicht jedoch durch Methylxanthine ¹²³.

In der Zelle wird Adenosin in Nukleotide umgewandelt, vor allem in Adenosin-5'-Monophosphat und Adenosin-5'-Triphosphat ¹²⁴. Die intrazelluläre Konzentration wird niedrig gehalten: Adenosin, das nicht in Nukleotide eingebaut werden kann, wird zu Inosin deaminiert ¹²⁵. Verläßt Adenosin aufgrund unterschiedlicher Stimuli (siehe auch 1.2.) die Zelle, so wurde vermutet, daß zunächst die intrazelluläre Konzentration an cAMP steigt und daß das durch Hydrolyse gebildete Adenosin jeweils sofort abgegeben wird ^{126,127}. Neuere Arbeiten deuten darauf hin, daß das Adenosin wohl vornehmlich in der Zelle aus ATP entsteht ¹²⁸; Abgabe von ATP durch die Zelle und eine denkbare, darauf folgende Adenosinproduktion durch Ektoenzyme scheint dagegen keine große Rolle zu spielen ¹²⁹. Bei der Adenosinabgabe bleibt die intrazelluläre Konzentration jeweils niedrig ¹³⁰, was mit der Tatsache in Verbindung gebracht wurde ¹³¹, daß Adenosin ein stark wirksamer Zellwachstumshemmer ist ⁴⁰. Der Mechanismus über den Adenosin zelltoxisch wirkt, ist unklar. Denkbar ist der erhöhte Verbrauch von Phosphoribosylpyrophosphat durch Adenosin und die darauf folgende unzureichende Pyrimidinnukleotidproduktion ¹³². Möglich ist auch eine erhöhte Produktion von S-Adenosylhomocystein, wie sie in Mäuse-T-Lymphom-Zellen beschrieben wurde ⁷¹.

Störungen des Adenosinstoffwechsels werden in der Hämatologie beschrieben: der angeborene Mangel an Adenosindeaminase geht mit schwerer Immundefizienz einher ⁴⁰, wäh-

rend eine Erhöhung der Adenosindeaminase (um das 45-70fache) bei hereditärer hämolytischer Anämie ¹⁶ und (um das 3-4fache) bei der angeborenen hypoplastisch-makrozytären Anämie Diamond-Blackfan ¹⁷ bekannt ist.

Erkenntnisse zur möglichen Bedeutung des Adenosins und seines Stoffwechsels bei zwei neurologischen Erkrankungen, dem Lesch-Nyhan-Syndrom und der Muskeldystrophie werden im Anhang (1.6.) dieser Einleitung dargestellt.



1.2. Adenosin im Zentralnervensystem

Auf die Bedeutung des Adenosins im Zentralnervensystem wurde zunächst durch biochemische Untersuchungen hingewiesen, die eine Stimulation der cAMP-Produktion durch Adenosin feststellten ¹³⁷. Es folgten elektrophysiologische Arbeiten, die die Hemmung evozierter und spontaner Potentiale im Zentralnervensystem durch Adenosin aufzeigten ^{113,140}. Auch konnte gezeigt werden, daß Adenosin sowohl den extrazellulären Anstieg von K⁺-Ionen als auch den Abfall der Ca²⁺-Konzentration hemmt und dadurch die Exzitabilität der Zelle herabsetzt ¹⁴². Die physiologisch relevante, tonisch inhibierende Wirkung ^{25,174} endogenen Adenosins auf Aktivität im Gehirn basiert auf verschiedenen Wirkungsmechanismen. Die Hemmung der Signaltransmission ist eine praesynaptische Adenosinwirkung und entsteht durch die Suppression des aktionspotential-induzierten Ca²⁺-Einstroms in das Axonterminal ¹³⁹. Unabhängig von dieser synaptischen Funktion vermag Adenosin die Kaliumleitfähigkeit der Nervenzellmembran zu erhöhen ^{148,149}, was die Fähigkeit zu wiederholter Erregung herabsetzt. Auf dieses Ergebnis stützt sich die Beschreibung des Adenosins als bedeutsames endogenes Antiepileptikum ⁸⁰. Zusätzlich zu diesen Mechanismen konnte gezeigt werden, daß Adenosin neben der praesynaptischen Ca²⁺-Modulation ebenfalls den Ca²⁺-Einstrom in die Zielnervenzelle hemmt und reguliert ¹³⁹.

Adenosin hemmt des weiteren - durch Methylxanthine antagonisierbar - die Abgabe verschiedener Neurotransmitter (Acetylcholin, Dopamin, Noradrenalin, Serotonin und Glutamin ^{33,55,56,142}). Die Hemmung der Abgabe von GABA wird diskutiert ^{33,42}. Adenosin, das selbst die Blut-Hirnschranke nicht überwindet ¹², bzw. seine agonistisch-wirkenden und mit steigender hydrophober Qualität (R-Phenylisopropyladenosin > N-Athylcarboxamidoadenosin) ³⁸ die Schranke besser durchbrechenden stabilen Derivate, vermittelt antiepileptische ^{37,80,94,181}, sedative ^{37,87,94,149,181}, schlafinduzierende ^{87,122} und in gewissen Konzentrationen REM-Schlaf fördernde ¹²² Wirkungen. Eine Adenosinausschüttung im Gehirn wird durch Ischämie ^{12,47}, Hypoxie

¹⁷), Hypotonus ¹⁸ und epileptische Aktivität ¹⁹ ausgelöst; bei Ischämie des Hirns kann das Adenosin im Liquor in den millimolaren Bereich ansteigen ¹².

Die Rolle, die systemisch zirkulierendes Adenosin seinerseits auf die zerebrale Durchblutung haben kann, ist unklar. Die Blutdruckerniedrigung, die die Verwendung von Adenosin bei neurochirurgischen Eingriffen an Aneurysmen, arteriovenösen Malformationen und vaskulären Tumoren interessant macht, geht mit deutlicher Reduktion des zerebralen Gefäßwiderstandes einher ²⁰. Ein lange wirksames Adenosin-Derivat - 2',3'-di-O-nitro-5'-(N-Athylcarboxamido)-Adenosin - bewirkt dagegen eine vermehrte Durchblutung des Gehirns ohne eine Veränderung des Blutdrucks zu vermitteln ²¹.

Neben dieser Vielfalt physiologischer und biochemischer Untersuchungen zu Adenosin und verwandten Substanzen gibt es einige wenige klinisch-pharmakologische Beobachtungen: 1968 beschrieben Delay und Deniker ²² die Verwendung von Adenosintriphosphat (ATP) als wirkungsvolles Mittel zur Verhütung und Abschwächung extrapyramidalen Nebenwirkungen nach Neuroleptikagabe; der zugrundeliegende Mechanismus dieser Wirkung ist bis heute unbekannt. Eine Untersuchung über Adenosin (und ATP) im Blut psychiatrisch Erkrankter zeigte eine signifikante Erhöhung der Konzentration bei schizophrenen und depressiven Patienten ²³.

1.3. Adenosin und zentral wirksame Substanzen

Eine gute Möglichkeit die Funktion des Adenosins im Zentralnervensystem näher zu definieren ist durch die Beschreibung der Interaktion zwischen Adenosin und zentral wirksamen Pharmaka gegeben ¹⁷⁵. Ausgehend von den hemmenden, sedativen und schlaffördernden Wirkungen des Adenosins konzentrierten sich die Untersuchungen auf Pharmaka mit ähnlichen bzw. reversen Wirkungsspektren.

1.3.1. Adenosin und Benzodiazepine

In Rattenhirnmembranfraktionen wird [³H]-Diazepam durch Adenosin-Agonisten und Antagonisten aus der Bindung verdrängt ^{113,118}. Die Purine Inosin und Hypoxanthin (siehe auch Abb.1) wurden als mögliche endogene Liganden des Benzodiazepinrezeptors diskutiert ¹¹⁹. Da Benzodiazepine den Adenosin-Uptake inhibieren ¹²⁰ wurde vermutet, daß sie vielleicht einige ihrer Wirkungen (Anxiolyse) über die Blockade der Adenosin-Inaktivierung und somit gesteigerter Verfügbarkeit endogenen Adenosins vermitteln ^{112,114}. Daß Anxiolyse nicht grundsätzlich durch gesteigerte Verfügbarkeit endogenen Adenosins am Adenosinrezeptor bewirkt wird, zeigte die Beobachtung, daß zwei Anxiolytika - Etazolam (SQ20009) und Cartazolam (SQ65396) - starke Adenosinrezeptorantagonisten sind ¹²⁰.

Es wird angenommen, daß Benzodiazepine ihre Wirkung über an GABA-Rezeptoren gekoppelte Benzodiazepin-Bindungsstellen vermitteln; die antiepileptische und sedative Wirkung der Benzodiazepine könnte aber durchaus Folge einer indirekten purinergen Aktion sein ^{112,178}. Diese Hypothese wird durch das Ergebnis unterstützt, daß einige Benzodiazepine wie Ro 15-1788 und Ro 5-4864 nicht wie die anderen Benzodiazepine über eine Verstärkung der GABA-ergen Funktion wirken ¹¹².

1.3.2. Adenosin und Neuroleptika

Nach der Beschreibung der Adenosin-Uptake-Inhibition durch Diazepam ¹² konnte ein ähnlicher Befund auch für zahlreiche Neuroleptika gefunden werden ¹³, wobei ein gewisser Zusammenhang zwischen der antipsychotischen Wirksamkeit und der Fähigkeit die Adenosininaktivierung zu verhindern festgestellt werden konnte ¹³.

Die Interaktion von Neuroleptika mit Dopaminrezeptoren ist jedoch wesentlich stärker ¹⁴ und daher eher geeignet die klinische Wirkung von Neuroleptika zu beschreiben; die Rolle des Adenosins bleibt unklar.

1.3.3. Adenosin und Antidepressiva

Elektrophysiologische Untersuchungen in vivo zeigten eine potenzierende Wirkung von Antidepressiva (auch von solchen Pharmaka, die den Noradrenalin-Uptake nicht beeinflussen) auf die adenosinerge Inhibition neuronaler Aktivität ¹⁵. In vitro-Experimente zeigten, daß tricyclische Antidepressiva den cAMP-Spiegel im Meerschweinchenhirn heben ^{16,17}. Es liegt nahe, daß diese Wirkung durch endogene Produktion und Abgabe von Adenosin vermittelt wird ¹⁸, da dieser Effekt durch Theophyllin blockierbar ist ^{16,17}. Es liegt hier möglicherweise eine Wirkungsparallele zur Elektrokrampftherapie vor, die ebenfalls die cAMP-Antwort auf Adenosin verstärkt ¹⁹.

1.3.4. Adenosin und Barbiturate

Erste Untersuchungen zeigten keine Interaktion zwischen Adenosin und Barbituraten : der hemmende Effekt von Adenosin auf Cortexneurone der Ratte konnte durch Barbiturate nicht verstärkt werden ¹⁴. Auch zeigte Pentobarbital keine Wirkung auf den Adenosin-Uptake ⁷. Bindungsstudien mit Membranfraktionen zeigten jedoch, daß verschiedene Barbiturate im pharmakologisch effektiven Konzentrationsbereich mit [³H] markierte A₁-Adenosin-rezeptorliganden aus der Bindung verdrängen ²⁰, was den

Schluß nahelegt, daß der A₁-Rezeptor in der Vermittlung der Barbiturateffekte eine Rolle spielen könnte.

1.3.5. Adenosin und Morphin

Methylxanthine hemmen die Wirkung von exogen zugeführtem Morphin ¹⁰⁹, wahrscheinlich auch von endogenen Opiaten ¹¹⁰; es wird vermutet ¹¹¹, daß Morphin einige seiner Wirkungen über eine Erhöhung extrazellulärer Adenosinspiegel im Gehirn vermittelt.

1.3.6. Adenosin und Alkohol

Alkohol hat keinen Einfluß auf den Uptake von Adenosin ¹¹². Zwei neuere Arbeiten diskutieren eine mögliche Interaktion zwischen Äthanol und Adenosin. An Mäusen konnte gezeigt werden, daß der Adenosin-Uptake-Hemmer Dipyridamol die Dauer des durch Äthanol induzierten Schlafes verdoppelt, während Theophyllin den hypnotischen Effekt von Äthanol um 50% reduziert ¹¹³. Rezeptorstudien mit Mäusen beschreiben nach zehntagiger Äthanolgabe einen Anstieg der Anzahl der R-PIA-Bindungsstellen um 28%; im Entzug (nach 24 und 48 Stunden) fielen die Bindungsstellen um 40% um sich nach 72 Stunden wieder auf den Ausgangswert einzupendeln. Die Dissoziationskonstante sinkt ebenfalls im Entzug ab um sich nach 72 Stunden zu normalisieren ¹¹⁴. Untersuchungen an genetisch selektiv alkoholsensitiven und nicht-sensitiven Mäusearten zeigten, daß R-PIA wie Alkohol an sensitiven Mäusen eine stärkere sedative und hypotherme Wirkung und Theophyllin eine stärkere exzitatorische Wirkung als bei nicht-sensitiven Mäusen besitzt ¹¹⁵.

1.4. Bindungsstellen für Adenosinrezeptorliganden

Die extrazellulären Adenosinrezeptoren werden unterteilt in einen A_1 - und einen A_2 -Rezeptor ^{66,129,171}. Der A_1 -Rezeptor wurde zunächst als die Adenylatcyclase hemmend beschrieben ¹⁷⁰, der A_2 -Rezeptor dagegen als stimulierend. Diese putativen Wirkungen führten historisch zu der A_1/A_2 -Unterscheidung, wobei aus heutiger Sicht anzumerken ist, daß der A_1 -Rezeptor keineswegs immer mit der Adenylatcyclase gekoppelt zu sein scheint und der A_2 -Rezeptor in Subtypen unterteilt werden muß, die Klassifikation nach A_1/A_2 aber dennoch weiterhin sinnvoll erscheint. Bei beiden Rezeptoren wirken Methylxanthine antagonistisch. Der A_1 -Rezeptor vermittelt die modulierende Funktion des Adenosins auf die neuronale Aktivität im Zentralnervensystem ^{36,129}, somit auch die antiepileptische Wirkung. Die Stärke der Modulation hängt offensichtlich von der Rezeptordichte ab ⁷; der A_1 -Rezeptor kann dabei sowohl praesynaptisch ^{33,80,163} als auch postsynaptisch ^{80,147,163} lokalisiert sein (siehe auch 1.2.). Der A_1 -Rezeptor konnte durch die Einführung radioaktiv markierter Liganden mit hoher spezifischer Aktivität gut charakterisiert werden ^{18,142,143,177}, auch in autoradiographischen Studien ^{81,82}. Demgemäß besitzt die Bindung der unterschiedlichen agonistischen und antagonistischen Liganden eine Sättigungskinetik entsprechend des Massenwirkungsgesetzes. Untersuchungen an Rattengewebe zeigen eine hohe Bindung im Gehirn; die Bindung in Leber und Niere ist zu vernachlässigen ¹⁷⁷. Innerhalb des Gehirns ist die A_1 -Bindung am höchsten im Cerebellum, Hippocampus, Cortex und Thalamus; gering ist die Anzahl der Bindungsstellen sowohl in der weißen Substanz als auch im Hypothalamus ⁸¹. In der Peripherie ist der A_1 -Rezeptor vor allem in Fettzellen und im ventrikulären Myokard präsent ^{2,39}. Die Affinitäten vieler Agonisten zum A_1 -Rezeptor liegen im nanomolaren Bereich ¹²⁸ und R-Phenylisopropyladenosin (R-PIA) ist effektiver als N-Äthylcarboxamidoadenosin (NECA) ¹²⁹. Die Bindung von A_1 -Adenosinrezeptoragonisten läßt sich durch Mg^{2+} und andere divalente Kationen steigern ^{3,49,142}, sowie durch Na^+ herabsetzen ⁴. Kalium- und

Lithium-Ionen sind unwirksam ¹⁰. Guaninnukleotide verändern die Bindung am A₁-Rezeptor im Sinne eines Wechsels von einem Zustand hoher zu niedriger Affinität ^{10,11,12}. Diese Beobachtung macht es sehr wahrscheinlich, daß der A₁-Rezeptor an ein guaninnukleotidabhängiges Element wie das inhibitorische Guaninnukleotid-Bindungsprotein N₁ gekoppelt ist ^{12,13}. Das N₁-Protein verbindet die Adenylatcyclase mit verschiedenen inhibitorisch wirkenden Rezeptoren. Ähnlich wie Guaninnukleotide vermag auch N-Athylmaleimid (NEM), ein SH-Gruppen-Alkylans, das zur Charakterisierung essentieller Cysteinyreste in Enzymen verwendet wird ^{14,15}, die Bindung von Agonisten durch Reduktion der Affinität herabzusetzen, eine Wirkung, die an Dopaminrezeptoren der Adenohypophyse ¹⁶, später auch an A₁-Adenosinrezeptoren ^{17,18} gezeigt werden konnte.

Studien über die strukturelle Natur des A₁-Adenosinrezeptorkomplexes durch Rezeptor-Solubilisation ^{19,20} und andere Verfahren ("target size analysis" ²¹, "photoaffinity labelling" ²²) zeigten, daß das A₁-Rezeptor-Effektor-System einen multimolekularen Komplex darstellt. Die Bestimmung der funktionellen Größe der [³H]-CHA-Bindungskomponente ergab mit 79500±7000 Dalton ²³ etwa doppelt soviel wie für das Ligand-Bindungs-Polypeptid bekannt ist ²⁴. Es bleibt offen, ob die funktionelle Ligand-Bindungs-Komponente ein Dimer von je 35000 Dalton darstellt oder ob die Diskrepanz zwischen "funktioneller" und "struktureller" Größe durch die Interaktion mit anderen Membrankomponenten wie etwa dem N₁-Protein zu erklären ist ²⁵.

Im Gegensatz zum A₁-Rezeptor sind die Affinitäten der verschiedenen Liganden zum A₂-Rezeptor im mikromolaren Bereich ²⁶ und NECA ist stärker als R-PIA ²⁷. Insgesamt ist die Charakterisierung des A₂-Rezeptors durch Bindungsstudien ^{28,29,30} schwieriger, da NECA, der bisher beste Ligand, auch auf den A₁-Rezeptor wirkt. Bindungsstellen für [³H]-NECA finden sich im Rattenhirn außer in den an A₁-Bindungsstellen reichen Regionen vor allem im Striatum, Nucleus accumbens, Tuberculum olfactorium und in gewissen Gebieten des Thalamus ³¹. In der Peripherie werden [³H]-NECA-Bindungsstellen vor allem in der Haut,

der Lunge, im Knochen, in Lymphocyten ^{2,39} und Thrombocyten ^{2,39,44} nachgewiesen. Da sich die [³H]-NECA-Bindungsstellen in Thrombocyten nicht als R-PIA-sensitiv erwiesen ⁴⁴, diese Substanz jedoch eine stimulierende Wirkung an A₂-Rezeptoren besitzt, dürfen Zweifel angemeldet werden, ob es sich bei diesen [³H]-NECA-Bindungsstellen um A₂-Rezeptoren handelt. Entsprechend diesen Ergebnissen darf eine Heterogenität der non-A₁-[³H]-NECA-Bindungsstellen angenommen werden.

Zusätzlich zur A₁/A₂-Klassifikation wird neuerdings auch ein A₃-Rezeptor diskutiert, der extrazellulär an Nervenendigungen und im Herzen vorkommen soll, nicht an die Adenylatcyclase gekoppelt ist und seine Wirkung über eine Interaktion mit Kalziumkanälen ausübt ³¹.

Neben den extrazellulären Rezeptoren wird auch eine auf der Innenseite der Plasmamembran lokalisierte P-Stelle beschrieben ^{39,47}, die ähnlich der A₁-Bindungsstelle eine Hemmung der Adenylatcyclase vermittelt, jedoch nicht durch Methylxanthine beeinflusst wird.

1.5. Fragestellungen

Ziel dieser Arbeit ist es, die Eigenschaften von A_1 - und A_2 -Rezeptoren durch die Bindung von [3H]-Cyclohexyladenosin ([3H]-CHA) (A_1) und [3H]-N-Athylcarboxamidoadenosin ([3H]-NECA) (A_2) mit Hilfe der quantitativen Autoradiographie ^{2,109,140} näher zu untersuchen. Die bisher vorliegenden Studien mit [3H]-CHA sind entweder quantitative Untersuchungen mit Membranfraktionen ^{10,129}, die keine Aussagen über Subregionen und eine mögliche auf dem Differenzierungsmerkmal unterschiedlicher Kompartimentierung aufbauende Heterogenität der A_1 -Bindung erlauben oder autoradiographische Studien, die rein qualitativ ausgewertet ^{31,82} ebenfalls keine Heterogenität ausschließen können. Über die Bindung von [3H]-NECA ist bekannt, daß nach Zugabe von A_1 -Agonisten ⁷⁸ und Antagonisten ⁷⁷ eine spezifische Verteilung im Rattenhirn zu beobachten ist. Diese Bindungsstellen sind zwar keine A_1 -Rezeptoren, ihre Identität als A_2 -Rezeptoren erscheint aber nicht unzweifelhaft. Studien mit alkylierenden Substanzen sollen - über die bekannte Wirkung auf A_1 -Rezeptoren ^{100,187} hinaus - weiteren Aufschluß über die [3H]-NECA-Bindung geben.

1.6. Anhang zur Einleitung

1.6.1. Exkurs I : Methylxanthine

A certain liquor which they
call coffe ... which will
soon intoxicate the brain.

William Parry,
A new and large Discourse of
the Travels of Sir Antonie
Sherley, 1601 ⁴⁷

Die Methylxanthine Theophyllin (1,3-Dimethylxanthin), Coffein (1,3,7-Trimethylxanthin) und Theobromin (3,7-Dimethylxanthin) sind die vom Menschen am häufigsten verwendeten psychotropen Substanzen. Während Coffein sein Wirkungsmaximum im Gehirn schneller als Theophyllin erreicht ¹³¹ ist Theophyllin die am stärksten wirksame Substanz ¹³⁰. Es ist allgemein anerkannt, daß die Methylxanthine über einen Antagonismus ¹³⁷ an Adenosinrezeptoren ¹³⁸ wirken. (Die Vermutung, daß Methylxanthine über eine Inhibition der Phosphodiesterase wirken könnten ¹³², gilt als widerlegt ^{35,114,124}.) Die Fülle der Informationen über Methylxanthine gewinnt somit Bedeutung für das Verständnis der möglichen Funktionen des agonistisch wirkenden endogenen Adenosins.

Die Wirkungen der Methylxanthine waren schon im vergangenen Jahrhundert Forschungsgegenstand der Neurobiologie. Nach ersten Untersuchungen durch Kraepelin ⁴⁸ im Jahr 1882 waren es sein Assistent Heinrich Dehio ³¹ und später Kraepelin ⁷⁰ selbst, die sich eingehend mit dem Effekt der Methylxanthine beschäftigten. Zur akuten Wirkung fand Kraepelin ⁷⁰, "dass der Thee die Auffassung und intellektuelle Verarbeitung äusserer Eindrücke erleichtert, die Umsetzung centraler Erregungszustände in Handlungen dagegen eher erschwert. ... Man könnte daraus den Schluss ziehen, dass der Thee eben das motorische Nervengewebe stärker beeinflusst, als das Substrat der Wahrnehmungs- und Associationsvorgänge, dass daher in jenem schon die

Lähmung sich geltend mache, während hier noch Reizerscheinungen vorwiegen."

Kraepelin beschrieb des weiteren auch die "chronische Wirkung dieser Mittel auf das Seelenleben. (Kaffee und Thee) können bei längerem Mißbrauche zur Entwicklung neurasthenischer Erscheinungen führen, ... (zu) dauernder Erregbarkeitssteigerung im Bereiche der intellektuellen Vorgänge, ... (zum) Ausbleiben des geistigen Ermüdungsgefühls und (zur) damit verbundenen Schlaflosigkeit."

Den heutigen Stand zur - akuten - koffeininduzierten organisch bedingten psychischen Störung spiegelt das DSM-III (Diagnostisches und statistisches Manual psychischer Störungen) der American Psychiatric Association wider. Unter Koffeinintoxikation (305.90) heißt es: "Die Hauptmerkmale sind ... Ruhelosigkeit, Nervosität, Erregung, Schlaflosigkeit, gerötetes Gesicht, Diurese und gastrointestinale Beschwerden. Diese Symptome erscheinen bei manchen Menschen bereits nach der Aufnahme von nur 250mg Koffein pro Tag, während andere sehr viel höhere Dosen vertragen. Bei mehr als 1g pro Tag können Muskelzuckungen, Perioden von Unerschöpflichkeit, psychomotorische Erregung, weitschweifiger Gedankengang und Redefluß und Herzrhythmusstörungen auftreten. Leichte sensorische Störungen wie Ohrenklingen und Lichtblitze wurden bei höherer Dosis beschrieben. Überschreitet die Dosis 10g so können Grand-Mal-Anfälle und Atemversagen, die zum Tode führen, auftreten." Zur Differentialdiagnose merkt das DSM-III an, daß "manische Episoden, Paniksyndrom oder generalisiertes Angstsyndrom ein klinisches Bild verursachen können, das dem der Koffeinintoxikation gleicht."

Zum Symptom der Schlaflosigkeit sei vermerkt, daß EEG-Studien im Schlaflabor zeigen, daß Coffein die Schlafdauer verkürzt und die Häufigkeit nächtlichen Aufwachens steigert¹⁵. Die einzelnen Schlafstadien sind jedoch im Gegensatz zur Hyposomnie bei Hypnotikaentzug nicht beeinträchtigt^{16,133}.

An Wirkungen der chronischen Zufuhr von Methylxanthinen werden in der modernen Literatur vor allem Toleranz und körperliche Abhängigkeit beschrieben^{17,63}. (In hoher

Dosierung bewirkt Coffein im Tierversuch sowohl eine Zunahme der A₁-Adenosinbindungsstellen - um bis zu 123% ¹⁰⁰ - als auch der Benzodiazepinbindung um 30% ¹⁰⁰ bzw. 45% ¹³.) Klinische Arbeiten beschreiben des weiteren ängstliche ^{92,99} und depressive ⁹² Symptome bei Coffeinismus, in Einzelfällen mag es bei Coffeinabusus sogar zur Exacerbation schizophrener Syndrome ¹⁰⁰ oder zur Auslösung eines maniformen ⁹² oder auch deliranten ¹³⁷ Syndroms kommen.

Im Coffein-Entzug kann es - über die Beendigung der potenten Vasokonstriktion - nach etwa 18 Stunden zu diffusen, klopfenden Kopfschmerzen kommen ^{97,114}. Die Rolle, die Methylxanthine und Adenosin bei der Behandlung bzw. Pathogenese der Migräne spielen könnten, ist in Diskussion ¹⁹.

Anerkannte Indikationen ¹²⁴ für eine Therapie mit Methylxanthinen sind die Prophylaxe und Behandlung obstruktiver bronchopulmonaler Erkrankungen (Theophyllin ist Mittel der Wahl beim status asthmaticus) sowie - über die Wirkung auf das Atemzentrum in der Medulla - die Apnoe bei Frühgeborenen.

In den ersten Jahren der Neuroleptikatherapie wurden Methylxanthine intravenös zur Behandlung von Früh-dyskinesien verwendet ⁹⁴. (Aus Versuchen mit Ratten ist bekannt, daß Coffeingabe der durch Phenothiazine verursachten katatonen Reaktion wirkungsvoll vorbeugen kann ¹⁰¹.) Zur langfristigen Gabe von Methylxanthinen ist bekannt, daß Therapiekonzepte der Sechzigerjahre in der UdSSR davon ausgingen, daß maßvolle Gabe von Coffein eine Besserung des Zustandes chronisch schizophrener Patienten bewirkt ¹⁰¹. Angesichts der Beobachtung, daß hospitalisierte psychiatrische Patienten verhältnismäßig viel Coffein konsumieren ¹⁰², warnen einige Autoren aus den USA dagegen vor der Zunahme einer psychotischen Symptomatik durch Methylxanthine ^{30,102}. Ebenfalls umstritten ⁹⁷ ist die therapeutische Gabe von Methylxanthinen bei hyperkinetischen Kindern mit "minimaler zerebraler Dysfunktion" ^{91,138}.

An Wechselwirkungen zwischen Methylxanthinen und Psychopharmaka ist bekannt, daß bei Ratten Monoaminoxidasehemmer die Toxizität von Methylxanthinen steigern ⁹¹.

Einfache in vitro-Mischversuche zeigten des weiteren, daß Kaffee und Tee mit einigen tricyclischen Antidepressiva und Neuroleptika schwerlösliche Präzipitate bilden ^{74,75}.

1.6.2. Exkurs II : Das Lesch-Nyhan-Syndrom

Als klinisch eindrucksvolle Manifestation einer Purinstoffwechselstörung im Zentralnervensystem ist das Lesch-Nyhan-Syndrom zu nennen, bei dem aufgrund eines x-chromosomal rezessiv vererbten Defekts die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT; siehe auch Abb.1) vermindert ist ^{83,106}. Der Mangel dieses Enzyms, das für die Purinreutilisation mitverantwortlich ist, führt etwa ab dem zweiten Lebensjahr zu geistiger Behinderung, spastischer Zerebralparese, Tremor, Dysarthrie, Epilepsie, Choreaathetose und Automutilation (vor allem der Lippen und Finger) ^{1,20,81,106}. Möglicherweise ist der Überschuß an Hypoxanthin und Xanthin für die neurologischen Symptome verantwortlich ¹⁷, wobei die Automutilation von Extremitäten bemerkenswerterweise auch experimentell nach parenteraler Überschußzufuhr von Methylxanthinen bei Ratten und Kaninchen zu beobachten ist ¹⁰⁶. Eine neuere Untersuchung ⁸³ hat gezeigt, daß beim Lesch-Nyhan-Syndrom zusätzlich zur Purinstörung auch ein allgemeiner Mangel an dopaminergem neuronaler Funktion vorhanden ist und zwar in den an Dopamin-Terminalen reichen Regionen Nucleus caudatus, Putamen und Nucleus accumbens. In diesem Zusammenhang sei die Beobachtung ⁸³ erwähnt, wonach Injektion von Adenosinrezeptorliganden in den linken Nucleus caudatus zusammen mit subcutaner Applikation des direkt wirkenden Dopaminagonisten Apomorphin bei Ratten eine Rotation nach links verursachte. Hierbei war N-Äthylcarboxamidoadenosin (NECA) deutlich effektiver als R-Phenylisopropyladenosin (R-PIA), was eine Interaktion mit dem A₂-Adenosinrezeptor nahelegt. Bei höherer Apomorphin-Dosierung bewirkte NECA bei den Versuchstieren dann auch Automutilation. Interessant erscheint, daß einer Ratte mit dieser Verhaltensauffälligkeit intraperitoneal Theophyllin gegeben wurde, was die Automutilation beendete. Die Autoren dieser

Arbeit ⁸³ vermuten, daß das Phänomen Automutilation mit der Entwicklung einer durch Theophyllinblockade verursachten Überempfindlichkeit auf Adenosin zusammenhängt. Insgesamt deutet die Arbeit darauf hin, daß Adenosin über den A₁-Rezeptor eine wichtige Rolle in der Modulation dopaminerger Funktionen im Striatum einnimmt.

1.6.3. Exkurs III : Muskeldystrophie

Untersuchungen zur Pathophysiologie der Muskeldystrophie geben Hinweis auf eine gesteigerte Dephosphorylierung von ATP zu Adenosin als mögliche Ursache der Erkrankung ⁷⁸: das Bindegewebe im Muskel von Duchenne-Patienten enthält erheblich mehr 5'-Nukleotidase als bei Gesunden ¹⁴. Ebenso gesteigert ist die HGPRT im Muskel und in den Erythrocyten dystrophischer Mäuse ¹⁰⁴. Vermindert ist dagegen die Phosphorylierung von Adeninnukleotiden in den Erythrocyten von Patienten mit Duchenne-Dystrophie sowie Curschmann-Steinert-Syndrom ¹⁰². Es wurde deshalb vermutet, daß die Symptomatik der Duchenne-Dystrophie durch den ATP-Mangel bedingt sein könnte ¹⁰⁵.

Interessant erscheint die ATP-Adenosin-Hypothese der Muskeldystrophie auch unter einem anderen Blickwinkel ¹⁰⁶: Wenn die Nekrose von Muskelfasergruppen bei beginnender Dystrophie durch Ischämie bewirkt wurde ³⁸, so könnte Adenosin als potent vasodilatierende endogene Substanz ^{107,108} eine Rolle spielen. Die erhöhte 5'-Nukleotidase ¹⁴ könnte als Versuch gedeutet werden, möglichst viel Adenosin zu bilden. Es sei erwähnt, daß in Analogie zu dieser Vermutung bekannt ist, daß die 5'-Nukleotidase ebenfalls nach der Läsion des Facialisnerven in den reaktiv proliferierenden Mikrogliazellen erhöht ist ⁷². Adenosin könnte somit bei dem Versuch unterschiedlicher Gewebe eine Rolle spielen die eigene Funktion wiederherzustellen.

2. Material und Methoden

2.1. Reagenzien

Folgende Substanzen wurden verwendet:

[³H]-Adenosin (Amersham Büchler, Braunschweig),

[³H]-Cyclohexyladenosin (New England Nuclear Chemicals,
Dreieich),

[³H]-N-Äthylcarboxamidoadenosin (Amersham Buchler,
Braunschweig),

Adenosindeaminase (Boehringer, Mannheim,
spezifische Aktivität: 200 U/mg),

N-Äthylmaleimid (Sigma-Chemie, München),

p-Chloromercuribenzoat (Sigma-Chemie, München),

R-Phenylisopropyladenosin (Boehringer, Mannheim),

S-Phenylisopropyladenosin (Boehringer, Mannheim),

N-Äthylcarboxamidoadenosin (Boehringer, Mannheim),

GppNHp (Boehringer, Mannheim),

AppNHp (Boehringer, Mannheim).

Alle anderen Reagenzien wurden von der Fa. Merck,
Darmstadt, bezogen.

2.2. Bindungsexperimente mit quantitativer Autoradiographie

2.2.1. Herstellung von Kryostatschnitten

Zur Durchführung der Bindungsstudien mit Hilfe der quantitativen Autoradiographie wurde zunächst pro Versuch eine männliche Sprague-Dawley-Ratte (180-220g) dekapiert, das Gehirn entnommen, auf NaCl getränktes Filterpapier gesetzt und mit CO₂ auf ein Kryostat-Klotzchen festgefroren. Am Kryostaten wurden dann 20x10⁻⁴m dicke Schnitte vom Rattenhirn gewonnen, wobei jeweils drei Schnittserien unter Berücksichtigung unterschiedlicher Hirnareale hergestellt wurden. Die erste Schnittserie enthielt jeweils Schnitte durch das Striatum, wobei u.a. auch der Cortex (area 2a), das Tuberculum olfactorium und der Nucleus accumbens dargestellt wurden (siehe auch Abb.5a). Die zweite Schnittserie enthielt Schnitte durch den Hippocampus, hier waren jeweils auch der Cortex (area 4l), Teile des Thalamus und ein kleiner Teil des Striatum angeschnitten (siehe auch Abb.5b). Die dritte Schnittebene enthielt jeweils Schnitte durch das Kleinhirn (siehe auch Abb.5c).

Die Kryostatschnitte wurden auf Objektträger gesetzt, die zuvor in eine Lösung aus 0,5g Gelatine und 0,05g Kaliumchromsulfat auf 100 ml aqua dest. getaucht und dann 24 Stunden getrocknet wurden. Die Objektträger mit den Hirnschnitten wurden vor der anschließenden Inkubation 60 Minuten lang an der Luft (Raumtemperatur) aufgetaut und getrocknet.

2.2.2. Durchführung der Bindungsversuche

Die Inkubation fand bei Raumtemperatur und durch einen 0,4ml-Tropfen statt, der genau auf den Hirnschnitt gesetzt wurde. Die Zusammensetzung von 1ml Inkubationsflüssigkeit war hierbei für alle Verdrängungsstudien wie folgt:

- 0,1 ml [^3H]-markierter Adenosinrezeptorligand
 - 100nM [^3H]-CHA bzw. 250nM [^3H]-NECA -
 (ergibt eine Endkonzentration von 10 bzw. 25nM)
- 0,1 ml verdrängender "kalter" Adenosinrezeptorligand
 - bei den Kontrollen 50mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4 -
 - zur Bestimmung der nicht-spezifischen Bindung
 wurden 0,1mM R-PIA bzw. 0,5mM NECA verwendet -
 (ergibt eine Endkonzentration von 0,01 bzw.
 0,05mM)
- 0,01ml Adosindeaminase (zur Elimination endogenen
 Adosins)

0,79ml 50mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4

Nach 90 Minuten wurden die Inkubationen durch Bader bei 0°C abgebrochen. Jeder Objektträger erfuhr fünf Waschungen in eiskaltem 50mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4. Der Puffer wurde dann durch zweimaliges Eintauchen in eiskaltem aqua dest. ausgewaschen. Die Objektträger wurden dann mindestens 12 Stunden im Abzug getrocknet und auf eine fest verschraubbare Kassette gelegt, in der ein autoradiographischer Film (LKB Ultrafilm) ca. 4 Wochen den radioaktiven Hirnschnitten exponiert wurde.

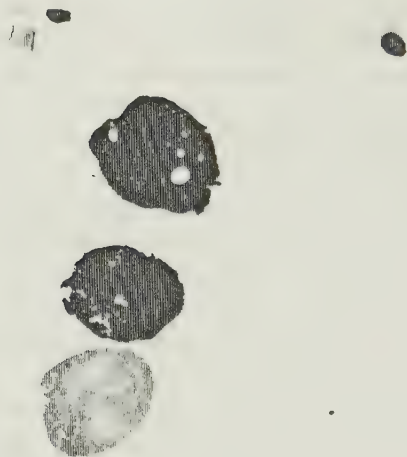
Zur Standardisierung der zu messenden Radioaktivität wurde auf jedem Autoradiographiefilm den radioaktiven Hirnschnitten auch ein Objektträger mit Standard-Schnitten beigefügt, dessen Herstellung der Abschnitt 2.3. beschreibt. Das Entwickeln der Filme wurde mit Lösungen der Fa. Agfa durchgeführt. Die Extinktionsmessungen an den Autoradiographiefilmen wurden mit Hilfe eines Textur-Analyse-Systems der Fa. Leitz vorgenommen.

Zu Beginn der Experimentserien wurden auch zwei Varianten des oben beschriebenen Vorgehens getestet. Schnelles Trocknen der Schnitte nach Inkubation und Waschung unter Zuhilfenahme eines Föns brachte keine Beeinflussung der Bindung jedoch auch keine Steigerung der Trocknungsqualität mit sich. Fixierung der Schnitte durch zweiminütige Inkubation in eiskalter Karlson-Schulz-Lösung und anschließender Trocknung vor der eigentlichen Inkubation zeigte einen Verlust von durchschnittlich 20% in der Bindungskapazität des Schnittes. Beide Varianten wurden verworfen und kamen in keinem Experiment zur Anwendung.

2.3. Herstellung von Standardschnitten

Zur Herstellung der Standards ¹⁴C wurden 15 männliche Wistar-Ratten (160-200g) dekapitiert. Nach Entnahme des Gehirns wurde die graue Substanz sorgfältig von der weißen Substanz getrennt, da weiße und graue Substanz bei Verwendung von mit Tritium markierten Liganden ein unterschiedliches Bindungsverhalten besitzen ². Die graue Substanz wurde im Mörser homogenisiert und in zehn zuvor aus Klebeband der Fa. Scotch unter einmaligem Wechsel der Drehrichtung gewickelte wallartige Röhrchen gegeben (Höhe 10mm, Durchmesser 9mm). Den Boden der Röhrchen bildete jeweils in NaCl getränktes Filterpapier. Auf diese mit grauer Substanz gefüllte Röhrchen wurden nun unterschiedliche Mengen an [³H]-Adenosin pipettiert. Der Röhrcheninhalt wurde jetzt gründlich durchmischt und das Ganze anschließend 3x20 Minuten lang im Vakuumexsiccator getrocknet um Luftblasen zu entfernen. In den zwei Intervallen wurde nochmals umgerührt. Die so erhaltenen Röhrchen samt Inhalt wurden mit ihrem Filterpapier auf Kryostat-Klötzchen gesetzt und mittels CO₂ durchgefroren. Die die graue Substanz umgebenden Scotch-tape-Röhrchen wurden nun vorsichtig abgetrennt. Von den Zylindern mit grauer Substanz wurden 20x10⁻⁴m dicke Kryostat-Schnitte gewonnen, die nach absteigender Radioaktivität auf in Gelatine vorgetauchte Objektträger angeordnet wurden (Abb.2). Von jedem Zylinder wurden auch je zwei Meßproben bestehend aus fünf Schnitten gewonnen um die Proteinmenge (Bestimmung nach Lowry et al. ¹⁰) bzw. die Zerfälle pro Minute zu bestimmen (Zähler der Fa. Beckman). Die hieraus errechneten Werte für die Zerfälle pro Minute je mg Protein lagen zwischen 641 und 1203763.

Abb. 2



2.4. Bindungsexperimente mit Membranfraktionen

Zur Durchführung der Bindungsstudien mit Hilfe von Membranfraktionen wurden 180-200g schwere männliche Sprague-Dawley-Ratten dekapitiert, das Gehirn entnommen und der Cortex bzw. der Hippocampus, das Striatum und das Cerebellum abpräpariert. Ein 10%iges Homogenat (9ml 5mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4 auf 1g Hirnsubstanz) wurde 30 Minuten lang bei 35000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und das Pellet nach Verwerfen des Überstandes wiederum in 5mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4 suspendiert. Zu diesem neuen Homogenat wurde pro 100 ml 1 ml Adenosindeaminase zur Elimination endogenen Adenosins hinzugegeben. Nach halbstündiger Inkubation bei 37°C wurde erneut 30 Minuten bei 35000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Das hierbei entstehende Pellet - aufgenommen in 50mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4 - ergab das Homogenat für die Bindungsstudien. Die Inkubationslösungen waren je ml wie folgt zusammengesetzt:

0,7ml 50mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4

0,1ml mit Adenosindeaminase vorbehandeltes Membranhomogenat

0,1ml mit [³H] markierter Adenosinrezeptorligand
(in 10facher Konzentration der angestrebten Endwerte)

0,1ml verdrängender "kalter" Adenosinrezeptorligand
-bei den Kontrollen 50mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4-
(in 10facher Konzentration der angestrebten Endwerte).

Zur Bestimmung der nicht-spezifischen Bindung wurden den hierzu verwendeten Inkubationslösungen 0,1ml R-PIA (0,1mM; Endkonzentration: 0,01mM) bzw. NECA (1mM; Endkonzentration 0,1mM) hinzugegeben, der Puffer-Anteil verringerte sich dadurch auf 0,6ml. Nach 90 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz durch Whatman GF/B-Glasfaserfilter gegeben, der Filter in Minivials der Fa. Beckman gegeben und mit 5ml Szintillationsflüssigkeit (Ready-Solv, HP) versehen. Nach halbstündigem Schütteln wurden die radioaktiven Proben in einem Beta-Zähler der Fa. Beckman gemessen.

2.5. Bindungsexperimente mit Vorbehandlung durch N-Äthylmaleimid oder p-Chloromercuribenzoat

Bei den Versuchen mit Hilfe der quantitativen Autoradiographie fand die N-Äthylmaleimid-Vorbehandlung nach der Trocknung der mit nicht radioaktiven Hirnschnitten belegten Objektträger statt. Die Objektträger wurden hierbei in kleine mit N-Äthylmaleimid-Lösung gefüllte Wannen getaucht und nach Ende dieser Vorbehandlung gründlich in 50mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4 gewaschen und getrocknet.

Bei den Versuchen mit Membranfraktionen wurden dem Homogenat (je 0,5ml) 1ml N-Äthylmaleimid bzw. p-Chloromercuribenzoat-Lösung hinzugegeben. Der Abbruch der Inkubation wurde durch übermäßige Verdünnung mit eiskaltem 50mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4 erreicht. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 19000 Umdrehungen pro Minute wurde der Überstand abgegossen, das Pellet mit 2ml 50mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4 versehen und in ein Homogenisatorgefäß gegeben. Danach fand dann wie in 2.4. beschrieben die Inkubation mit [³H]-markierten Rezeptorliganden statt.

3. Ergebnisse

3.1. Bindung von [3 H]-Cyclohexyladenosin - Studien mit quantitativer Autoradiographie

Die zur Standardisierung sämtlicher Autoradiographie-Ergebnisse benötigte Referenzkurve zeigt Abb.3. Die Standardschnitte, deren Herstellung 2.3. schildert, wurden 1-4 Wochen lang entsprechend dem in 2.2.2. geschilderten Verfahren auf einen Autoradiographiefilm gelegt und mittels Textur-Analyse-System ausgewertet. Die Referenzkurve und die jedem Film beigelegte Standard-Kontrolle (Abb.2) erlaubt die Konversion der gemessenen Extinktionswerte in Zerfälle pro Minute je mg Protein. Sättigungskurven, die durch Verwendung von 0,5-50nM [3 H]-CHA konstruiert wurden, ergeben durch Scatchard-Analyse ^{10,21} die in Tab.1 aufgeführten Ergebnisse.

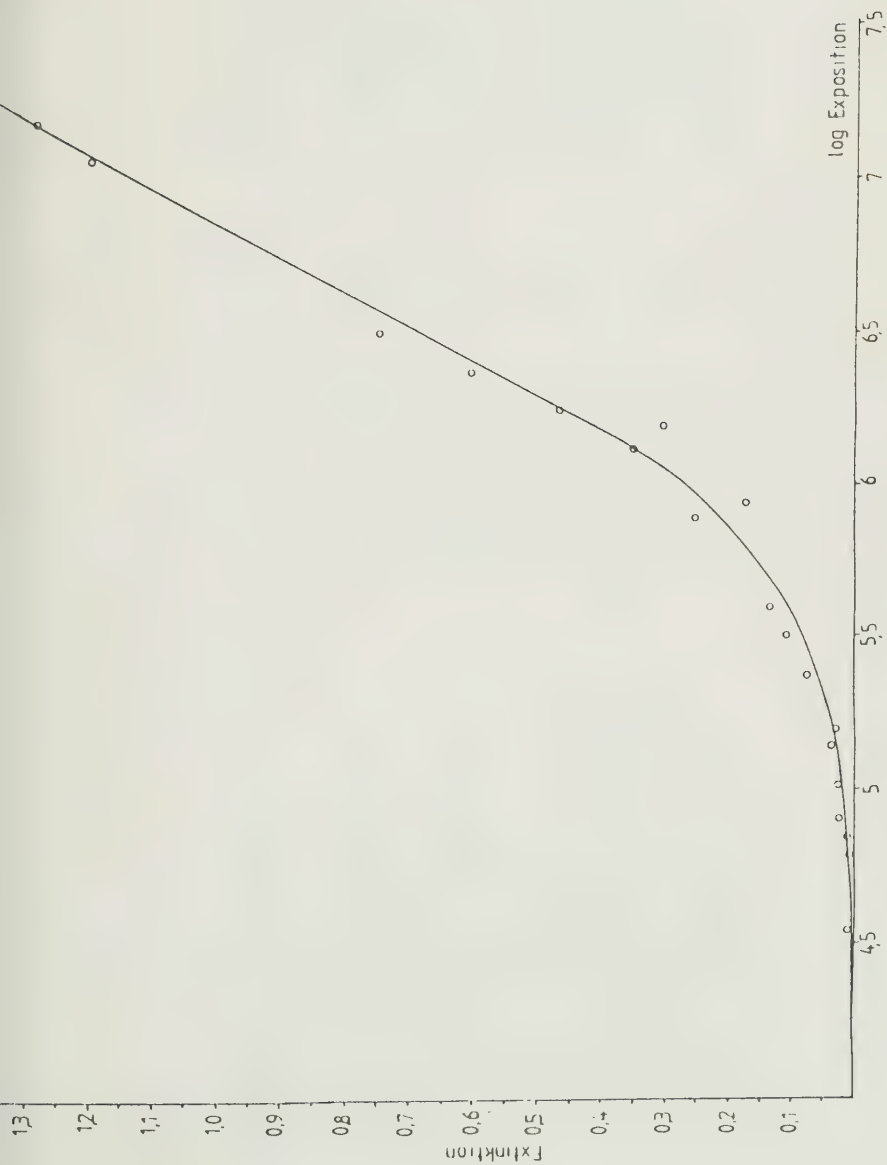
B_{max} bezeichnet dabei die maximale Bindungskapazität, K_d die Dissoziationskonstante. Abb.4 zeigt als Beispiel den Scatchard-Plot des stratum radiatum der CA1-Region des Hippocampus. Abb.5a-c demonstriert die Verteilung der [3 H]-CHA-Bindungsstellen im Striatum-, Hippocampus- und Cerebellum-Schnitt. Tab.1 zeigt, daß die Affinitäten für [3 H]-CHA in den verschiedenen Hirnregionen nicht signifikant unterschiedlich sind. Die Werte für die Dissoziationskonstante K_d liegen etwas höher, als dies bisher für Membranfraktionen beschrieben wurde ^{11,12}. Auch die Werte für die maximale Bindung liegen etwas höher als die bisher publizierten Werte für Membranfraktionen. Dieses Phänomen wurde bereits für andere Rezeptorsysteme beschrieben ¹³.

Ein Beispiel für durch quantitative Autoradiographie erhaltene Verdrängungskurven zeigt Abb.6 anhand des Striatum. Die Reihenfolge der Potenz unterschiedlicher kalter Adenosinrezeptorliganden [3 H]-CHA zu verdrängen ist R-PIA > NECA > S-PIA. In Analogie zu Ergebnissen mit Membranfraktionen ^{10,11} zeigen die [3 H]-CHA-Bindungsstellen somit die Eigenschaften des A₁-Adenosinrezeptors. Die auf den Tabellen 2-4 dargestellten Daten zu den Verdrängungsstudien wurden mittels Hill-Analyse ermittelt ^{10,21,14}. Die

Hill-Zahl ist dabei ein Maß für die Anzahl von Bindungsstellen pro Rezeptor. IC_{50} bezeichnet jene Konzentration des nicht markierten Liganden, bei dem die Bindung von $10nM$ [3H]-CHA um 50% verdrängt wird. K_i ist die Bindungsaffinitätskonstante des nicht markierten Liganden.

Die Ergebnisse der Studien zur Beeinflussung der [3H]-CHA-Bindung durch Guanin- und Adenin-Nukleotide zeigt Tab.5. Das schwer hydrolysierbare Guanosintriphosphat-Derivat GppNHp setzt die Bindung in sämtlichen Hirnregionen herab. Das Adenosintriphosphat-Derivat AppNHp verändert in verschiedenen Regionen die Bindung auf unterschiedliche Weise.

Abb. 3



[³H]-CHA-Bindung
Scatchard-Analyse

Quantitative Autoradiographie

Tabelle 1

	Bmax [pmol/mg Prot.]	Kd [nM]	Korrelations- Koeffizient	
Hippocampus Stratum oriens CA1	2,31	6,12	0,947	y = -0,164x + 0,347
Stratum radiatum CA1	2,34	5,88	0,955	y = -0,170x + 0,394
Stratum lacunare CA1	1,49	6,32	0,897	y = -0,158x + 0,235
Gyrus dentatus Stratum moleculare	2,10	7,01	0,965	y = -0,143x + 0,299
Gyrus dentatus Stratum granulare	1,21	7,23	0,944	y = -0,138x + 0,167
Stratum infragranulare Inneres Blatt	2,08	6,18	0,951	y = -0,162x + 0,336
CA4 Zellschicht	1,28	7,25	0,873	y = -0,138x + 0,176
Stratum infragranulare Äußeres Blatt	1,96	6,22	0,991	y = -0,161x + 0,316
Stratum oriens CA3	1,75	7,77	0,989	y = -0,129x + 0,225
Stratum radiatum CA3	1,78	7,6	0,985	y = -0,132x + 0,234
Nucleus thalamicus lateralis posterior	1,7	8,02	0,956	y = -0,125x + 0,213
Cortex Area 4: 4. Schicht	1,9	6,22	0,975	y = -0,161x + 0,305
Cortex Area 4: 6. Schicht	1,27	6,21	0,855	y = -0,161x + 0,205
Striatum	1,03	7,23	0,919	y = -0,138x + 0,143
Lateraler Septumkern - dorsal	1,15	5,62	0,953	y = -0,178x + 0,205
Cortex Area 2a: 4. Schicht	1,44	7,65	0,962	y = -0,131x + 0,189
Cortex Area 2a: 6. Schicht	1,07	6,45	0,975	y = -0,155x + 0,166
Cerebellum Molekularschicht	2,59	5,19	0,928	y = -0,193x + 0,499
Cerebellum Körnchenzellschicht	0,83	5,9	0,916	y = -0,170x + 0,140

Abb. 4

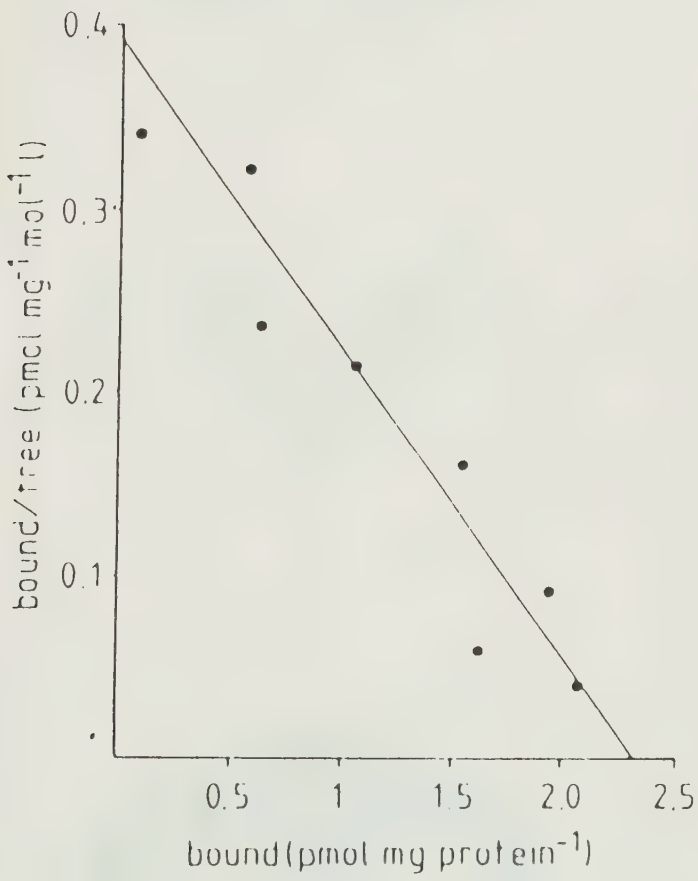


Abb. 5

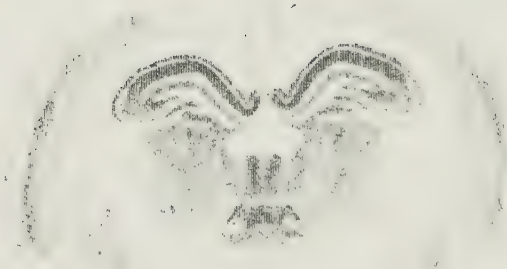
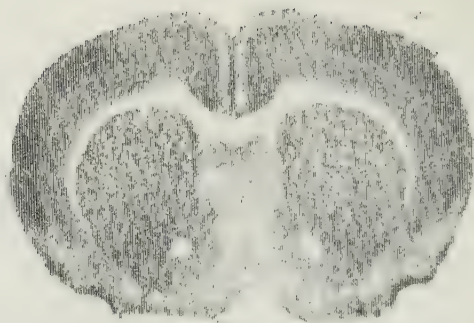
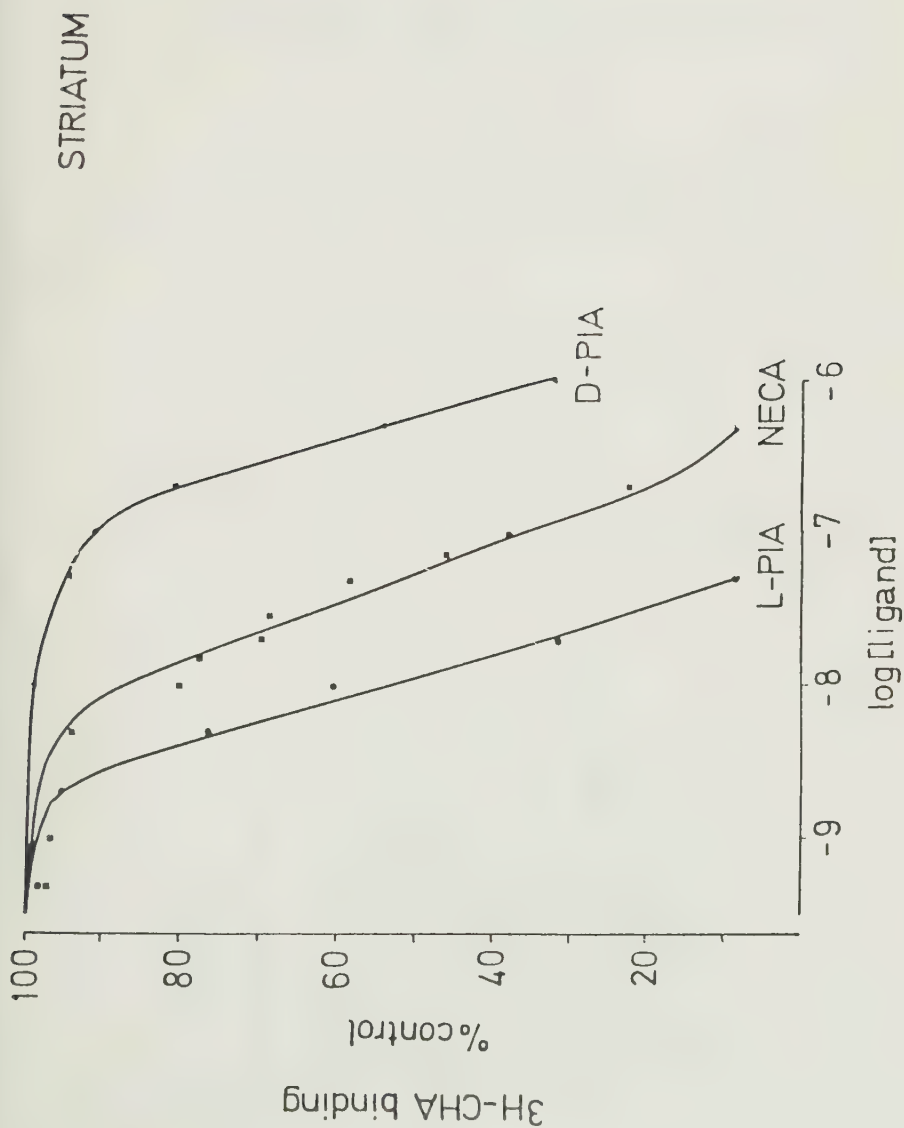


Abb. 6



[³H]-CHA-Bindung Quantitative Autoradiographie Tabelle 2

	IC ₅₀ [nM]	R-PIA-Verdrängung Hill-Zahl	Korrelations- Koeffizient	K _i [nM]
Hippocampus Stratum oriens CA1	8,18	1,076	0,951	3,11
Stratum radiatum CA1	8,29	1,189	0,949	3,07
Stratum lacunare CA1	8,73	1,137	0,832	3,38
Gyrus dentatus Stratum moleculare	9,67	1,206	0,945	3,99
Gyrus dentatus Stratum granulare	8,73	1,128	0,925	3,66
Stratum infragranulare Inneres Blatt	10,39	1,1	0,941	3,97
CA4 Zellschicht	6,24	1,052	0,926	2,62
Stratum infragranulare Äußeres Blatt	7,52	1,009	0,956	2,88
Stratum radiatum CA3	9,8	1,005	0,946	4,2
Stratum oriens CA3	9,59	1,229	0,947	4,19
Cortex Area 41 4.Schicht	9,01	1,001	0,914	3,46
Cortex Area 41 6.Schicht	7,93	1,006	0,883	3,04
Striatum				
Cortex Area 2a 4.Schicht	10,16	1,098	0,972	4,26
	10,59	1,004	0,975	4,59
Cerebellum Molekularschicht	7,55	1,018	0,914	2,58

Tabelle 3

Quantitative Autoradiographie

[³H]-CHA-Bindung

	IC ₅₀ [nM]	NECA-Verdrängung		K _i [nM]
		Hill-Zahl	Korrelations- Koeffizient	
Hippocampus Stratum oriens CA1	36,7	1,033	0,961	13,9
Stratum radiatum CA1	45,2	1,072	0,964	16,7
Gyrus dentatus Stratum moleculare	39,0	1,154	0,984	16,0
Stratum oriens CA3	36,7	1,042	0,931	16,0
Stratum radiatum CA3	37,9	1,066	0,959	16,4
Cortex Area 41 4. Schicht	38,1	1,049	0,979	14,9
Striatum	38,5	0,979	0,979	16,2
Cerebellum Molekularschicht	34,7	0,994	0,988	11,9

[³H]-CHA-Bindung Quantitative Autoradiographie Tabelle 4

	IC ₅₀ [nM]	S-FIA-Verdrängung		K _i [nM]
		Hill-Zahl	Korrelations- koeffizient	
Hippocampus Stratum oriens CA1	774	0,977	0,979	294
Stratum radiatum CA1	610	0,992	0,991	226
Gyrus dentatus Stratum moleculare	763	0,987	0,976	314
Stratum oriens CA3	628	0,981	0,98	275
Stratum radiatum CA3	588	1,016	0,99	254
Cortex Area41 4. Schicht	652	0,986	0,986	250
Striatum	619	1,115	0,995	260
Cerebellum Molekularschicht	694	0,962	0,99	237

[3H]-CHA-Bindung Quantitative Autoradiographie Tabelle 5

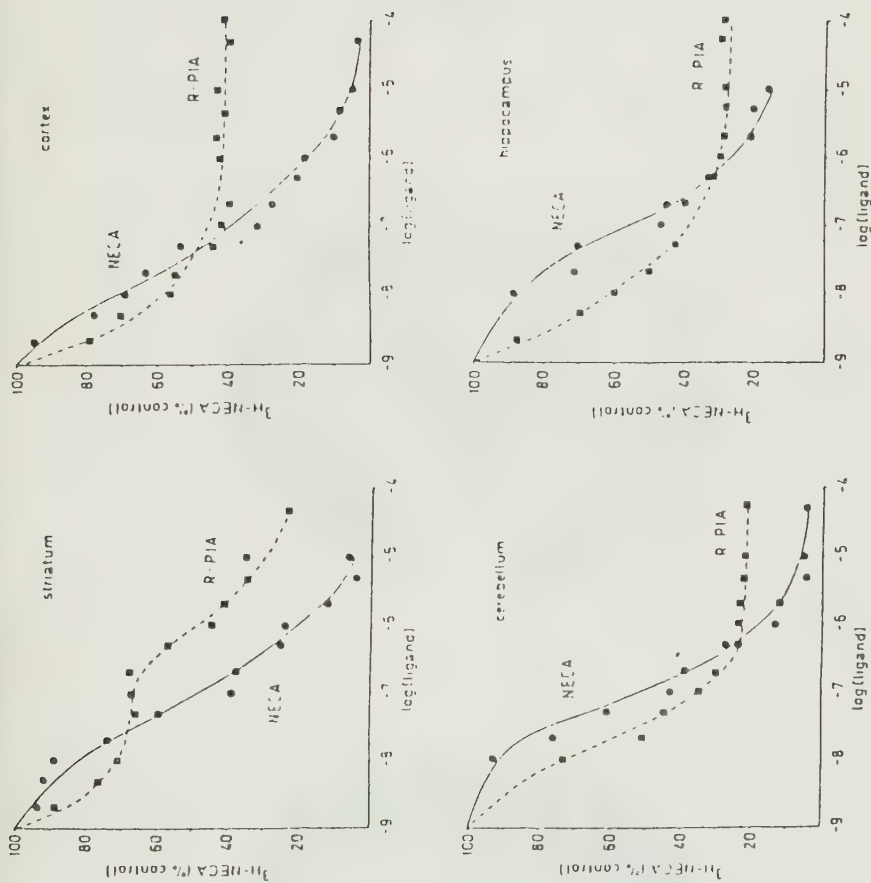
	spezifische Bindung in % der Kontrolle		
	GppNHp		AppNHp
	0,01mM	0,1mM	
Hippocampus Stratum oriens CA1	69,6	41,6	131,4
Stratum radiatum CA1	63,9	35,0	127,5
Stratum lacunare CA1	67,4	41,0	144,4
Gyrus dentatus Stratum moleculare	60,3	30,6	140,7
Gyrus dentatus Stratum granulare	50,4	45,7	141,2
Stratum infragranulare Inneres Blatt	59,7	36,6	122,0
CA4 Zellschicht	61,8	45,0	139,5
Stratum infragranulare Aueres Blatt	63,5	35,3	131,8
Stratum radiatum CA3	72,0	41,8	158,3
Stratum oriens CA3	77,6	44,8	141,5
Cortex Area 41 4.Schicht	85,0	36,3	166,7
Cortex Area 41 6.Schicht	64,6	40,9	140,2
Striatum	50,9	22,9	60,2
Cortex Area 2a 4.Schicht	63,5	19,9	90,6
Cerebellum Molekularschicht	55,5	21,3	79,4

3.2. Bindung von [3 H]-N-Äthylcarboxamidoadenosin

3.2.1. Studien mit Membranfraktionen

Durch Verdrängung mit R-PIA und NECA kann die Bindung von [3 H]-NECA an Membranfraktionen gut charakterisiert werden (Abb. 7). In den vier Regionen, von denen Membranfraktionen hergestellt wurden, ist R-PIA im nanomolaren Bereich effektiver als NECA in der Verdrängung von [3 H]-NECA, was für das Vorhandensein des A_1 -Adenosinrezeptors spricht. Bei Konzentrationen von etwa 10^{-6} M ist jedoch NECA stärker als R-PIA. In Membranfraktionen von Cortex, Hippocampus und Cerebellum ist R-PIA nicht in der Lage [3 H]-NECA über einen bestimmten Punkt hinaus zu verdrängen: es kommt hier zu einer Art Plateaubildung. Einzig im Striatum kann die Bindung durch R-PIA weiter reduziert werden, wenn auch nicht auf das Niveau, das durch hohe NECA-Konzentrationen erreicht werden kann.

Abb. 7



3.2.2. Studien mit quantitativer Autoradiographie

Die mittels quantitativer Autoradiographie erhaltenen Ergebnisse zur Verdrängung von [3 H]-NECA durch unterschiedliche Adenosinrezeptorliganden listet Tab.6 auf. Die Verteilung der [3 H]-NECA-Bindungsstellen (Kontroll-schnitte) zeigt Abb.8a-c. Abb.9 demonstriert am Beispiel Striatum, daß neben der A_1 -Bindungsstelle mindestens eine nicht A_1 -Bindungsstelle vorhanden sein muß. Abb.10 zeigt wie R-PIA im Striatum die [3 H]-NECA-Bindung weniger effektiv herabsetzt als im an non- A_1 -Bindungsstellen ärmeren Cerebellum.

Inkubation der Hirnschnitte bei 0°C vermindert die Verdrängung durch R-PIA im Striatum (Abb.11), die Verdrängung durch NECA bleibt dagegen unbeeinflusst (Abb.12).

Tabelle 6

		Hill-Zahl	IC ₅₀ [nM]	Korr. -Koeff.
Striatum	R-PIA	0,236	35300	0,913
	S-PIA	0,215	31400	0,875
	NECA	0,701	450	0,906
Cerebellum	R-PIA	0,351	236	0,945
	S-PIA	0,425	754	0,97
	NECA	0,813	48,6	0,949

Abb. 8

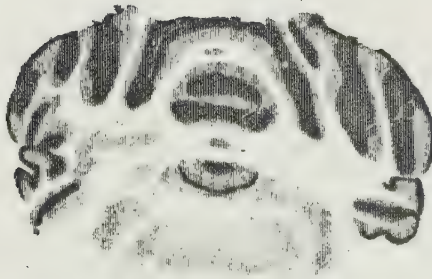
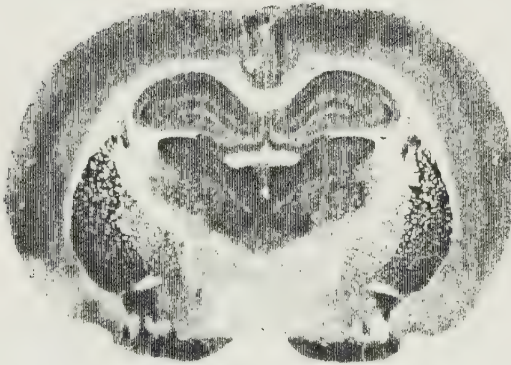
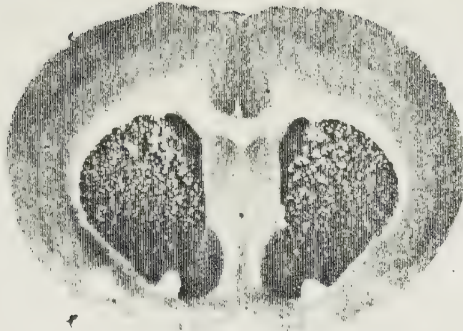


Abb. 9

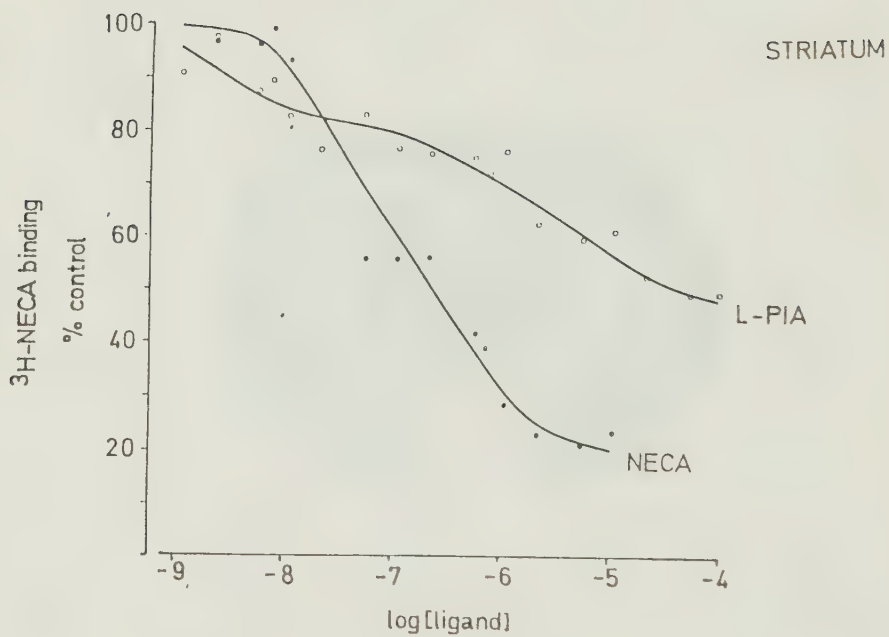


Abb. 10

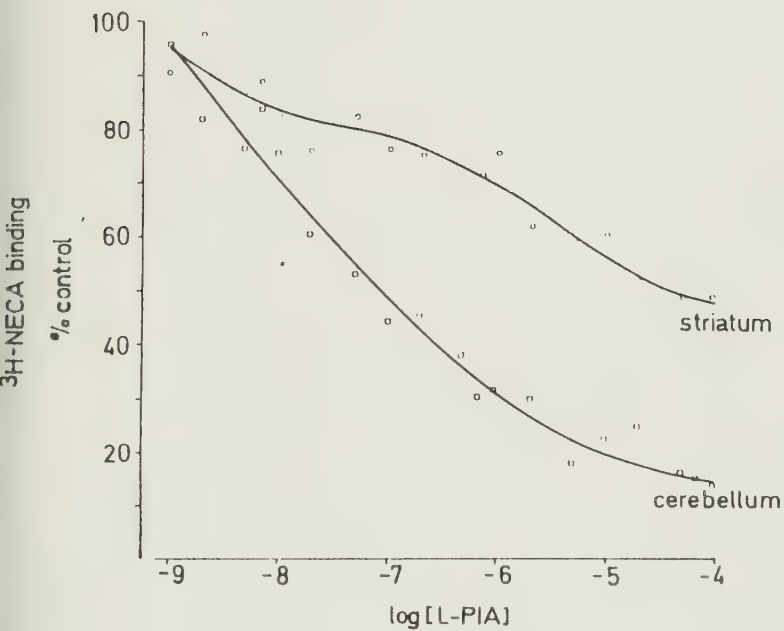


Abb. 11

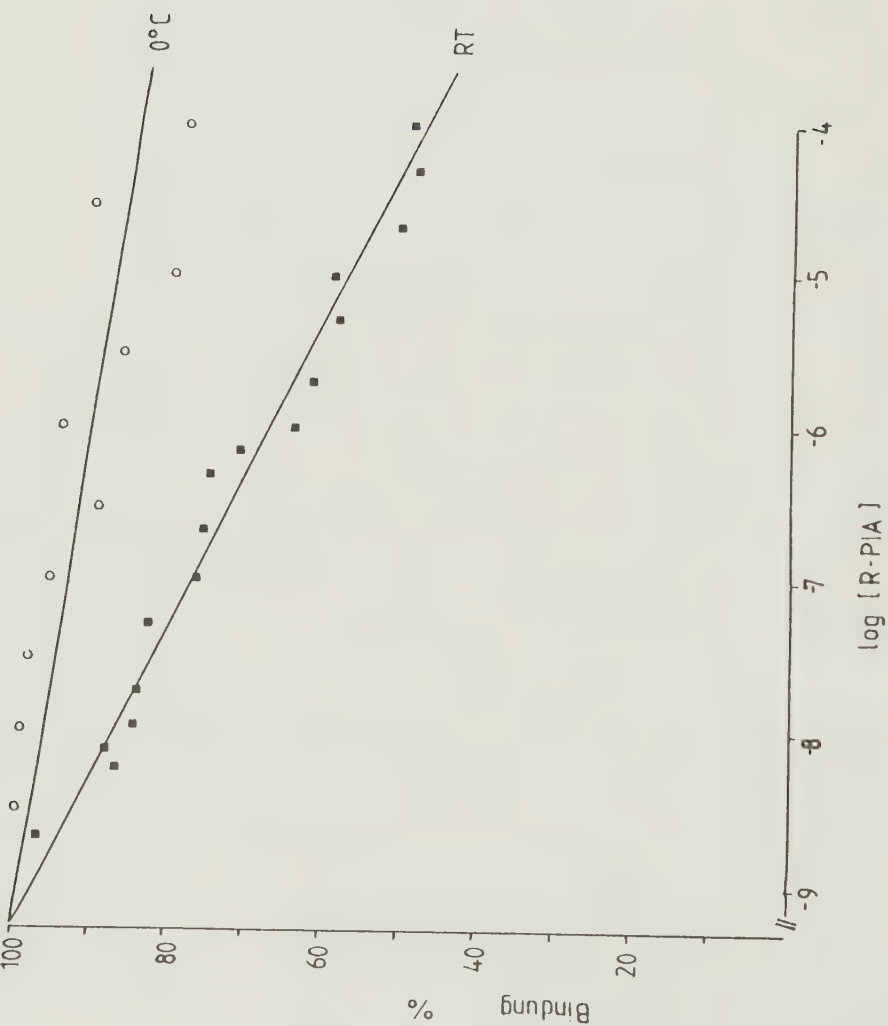
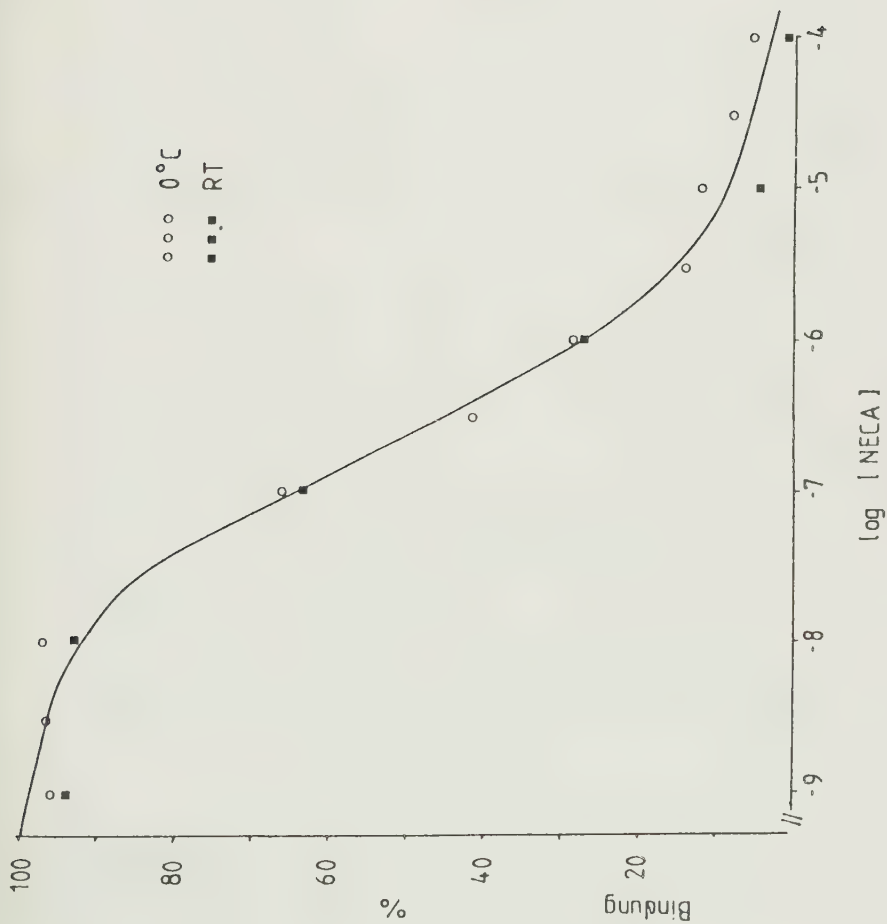


Abb. 12



3.3. Bindung nach Vorbehandlung mit N-Athylmaleimid oder p-Chloromercuribenzoat

3.3.1. Studien mit Membranfraktionen

Die Versuche mit Membranfraktionen dienten dazu, die Wirkung von N-Athylmaleimid (NEM) zu prüfen und die Abhängigkeit dieser Wirkung von Temperatur, Zeit und Konzentration zu bestimmen.

An durch 2nM [^3H]-Cyclohexyladenosin ([^3H]-CHA) markierten A_1 -Bindungsstellen zeigte 1mM NEM eine Temperatur- und Zeitabhängigkeit (Abb.13). Ein Versuch mit unterschiedlichen NEM-Konzentrationen (jeweils bei 30 Minuten) zeigte, daß sowohl bei 0°C als auch bei Raumtemperatur 1mM ausreichte um die spezifische [^3H]-CHA-Bindung auszuschalten (Tab.7).

Ein weiterer Versuch zeigte, daß mit p-Chloromercuribenzoat (PCMB) ¹⁰³ auch ein anderes Thiol-Reagens in der Lage ist A_1 -Bindungsstellen zu beeinflussen (Tab.8).

Es folgten Untersuchungen mit 25mM [^3H]-N-Athylcarboxamidoadenosin ([^3H]-NECA). Abb.14 zeigt den Einfluß von Temperatur und Zeit auf die NEM-Reaktion und verdeutlicht, daß 1mM NEM vorwiegend auf die A_1 -Bindungsstellen wirkt (jene [^3H]-NECA-Bindungsstellen, welche durch $1 \times 10^{-6}\text{M}$ R-Phenylisopropyladenosin verdrängbar sind). Tab.9 zeigt, daß 1mM NEM die A_1 -Bindungsstellen vollständig eliminiert und daß 2 und 3mM NEM die [^3H]-NECA-Bindungsstellen zwar über die A_1 -Komponente hinaus reduziert aber nicht gänzlich inaktiviert. Schließlich konnte der Effekt von PCMB auch auf die [^3H]-NECA-Bindung gezeigt werden (Tab.10).

Abb. 13

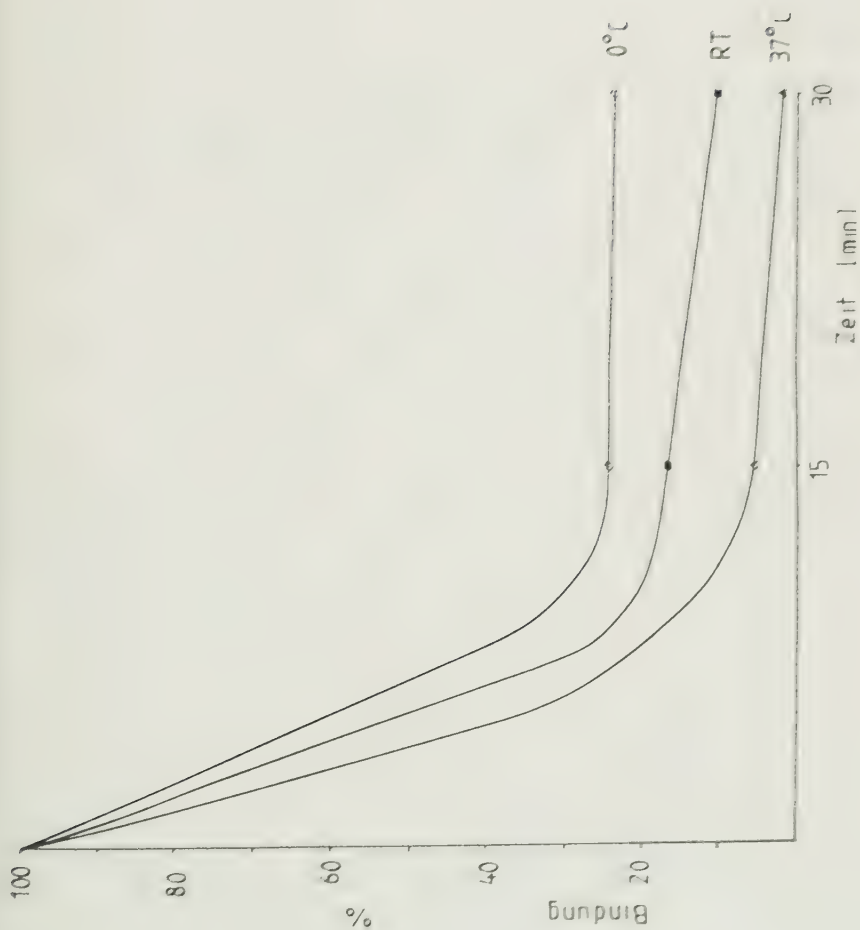


Tabelle 7

Konzentration	% der spezifischen Bindung bei	
NEM [mM]	0°C	Raumtemperatur
1	6,7	2,4
2	6,4	1,8
3	3,6	1,2

Tabelle 8

Konzentration	% der spezifischen Bindung bei	
PCMB [mM]	0°C	Raumtemperatur
0,2	23	7
0,5	12	0
1	4	0

Abb. 14

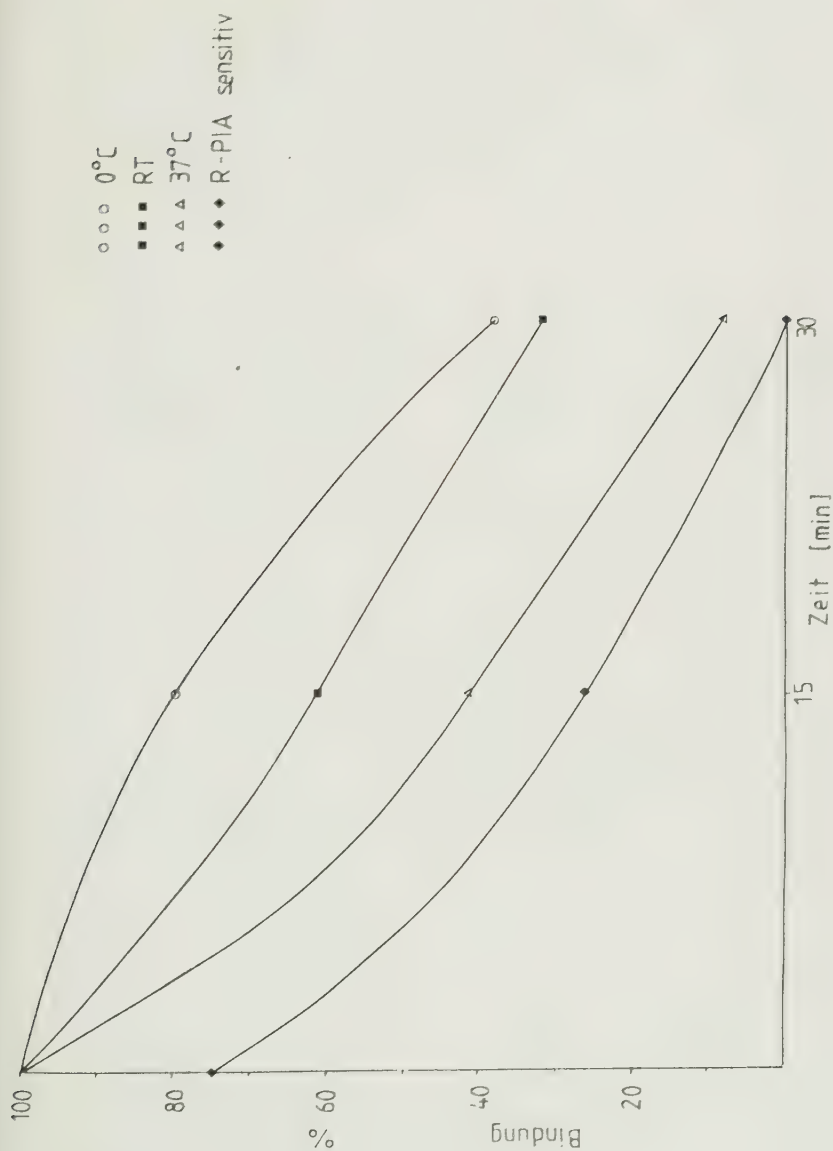


Tabelle 9

Konzentration NEM [mM]	% der spezifischen Bindung			
	R-PIA [10^{-6} M]	sensitiv	0°C	Raumtemperatur
0		28,5	100,0	100,0
1		0	74,3	70,0
2		0	59,9	51,8
3		0	51,5	49,3

Tabelle 10

Konzentration PCMB [mM]	% der spezifischen Bindung		
	gesamt	R-PIA [10^{-6} M]	sensitiv
0	100		41
0,2	72		21
0,5	63		15
1	54		2

3.3.2. Studien mit quantitativer Autoradiographie

Abb.15 zeigt die Verdrängung durch NECA und R-PIA in mit NEM vorbehandelten (15', 1mM, 37°C) Striatumschnitten. Nach Elimination der A_1 -Komponente der [3H]-NECA-Bindung ist NECA effektiver in der Verdrängung als R-PIA, was für das Vorhandensein des A_2 -Adenosinrezeptors spricht. Die Hill-Zahl von etwa 1 deutet auf die Interaktion mit einer einzigen Bindungsstelle hin (siehe auch im Vergleich Tab.6 und Abb.9).

Tab.11 und Abb.16 zeigen den Einfluß unterschiedlicher NEM-Konzentrationen auf verschiedene Hirnareale.

Abb.17a-d verdeutlicht die Elimination von [3H]-NECA-Bindungsstellen durch steigende NEM-Konzentrationen (Kontrolle, 0,1mM, 1mM, 5mM) anhand von Hippocampus-Schnitten. Nach Beigabe von 10^{-6} M R-PIA zur Elimination der A_1 -Komponente konnten die in Tab.12 aufgelisteten sowie in Abb.18 dargestellten Ergebnisse erhalten werden. Striatum, Nucleus accumbens und Tuberculum olfactorium reagieren weniger sensibel auf die NEM-Vorbehandlung als die übrigen Regionen. Das gilt auch für den Cortex und Thalamus, deren R-PIA unempfindliche non- A_1 -Bindungsstellen sich als deutlich NEM sensitiv erweisen.

Abb.19 zeigt die Lokalisation der non- A_1 -Bindungsstellen: die in Abb.19a-c dargestellten Schnitte wurden in Anwesenheit von 10^{-6} M R-PIA inkubiert, Abb.19d-f zeigt die Wirkung der Vorbehandlung mit 3mM NEM.

Abb. 15

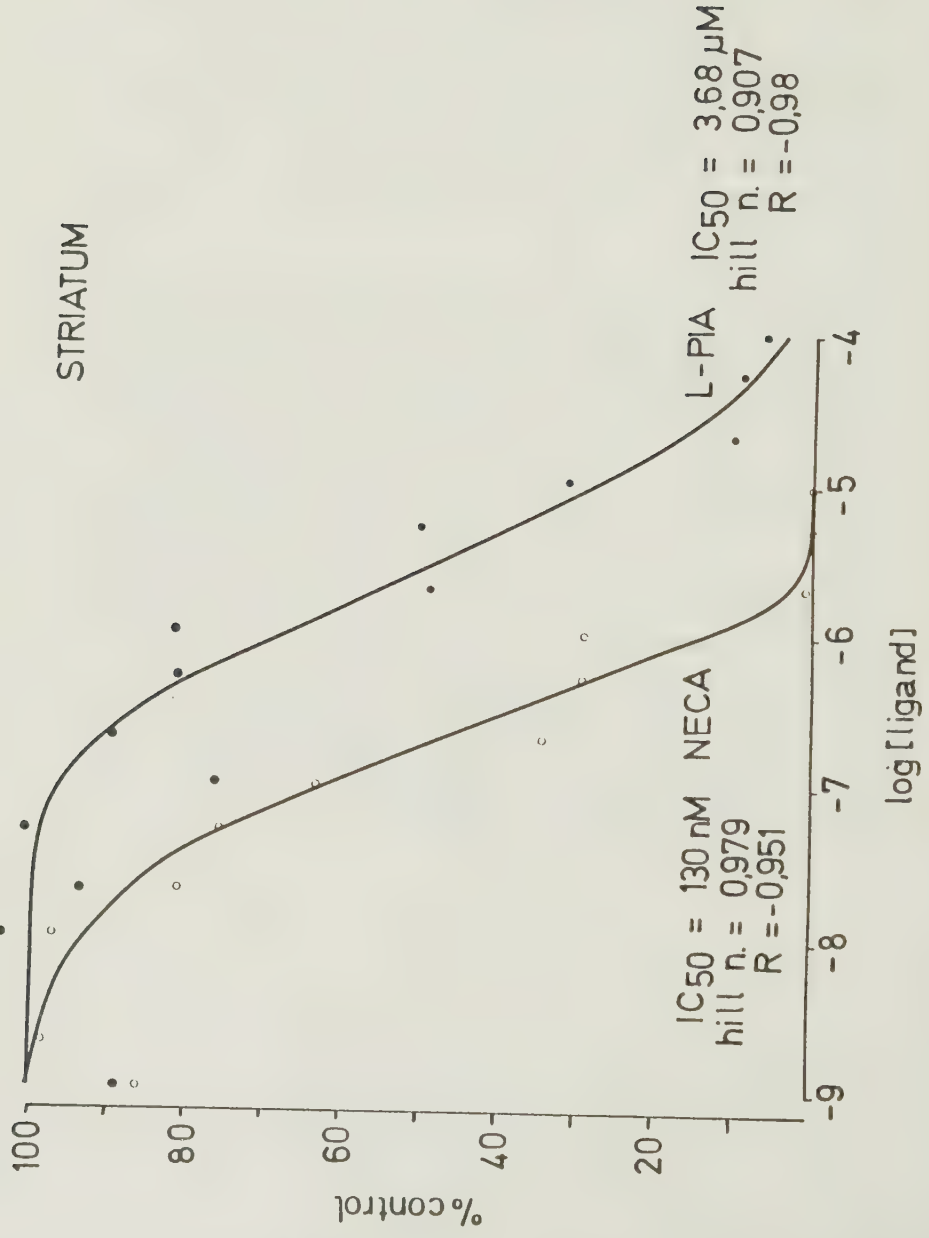


Tabelle 11

[³H]-NECA-Bindung Quantitative Autoradiographie
Vorbehandlung mit NEM (20°C, 30')

NEM-Konzentration [mM]	Cortex		% der Bindung		Tuberculum olfactorium
	Area 41	6. Schicht	Nucleus thalamicus lateralis posterior	Striatum	
0,01	95,8		92,3	92,4	92,4
0,02	89,4		86,9	94,1	87,3
0,05	82,2		87,8	92,4	97,7
0,1	80,2		91,7	81,9	94,8
0,2	78,2		83,7	80,0	93,7
0,5	67,3		76,7	80,0	82,3
1	46,1		49,8	63,5	70,2
2	12,8		23,8	46,3	54,9
5	24,1		15,2	44,8	42,4

Abb. 16

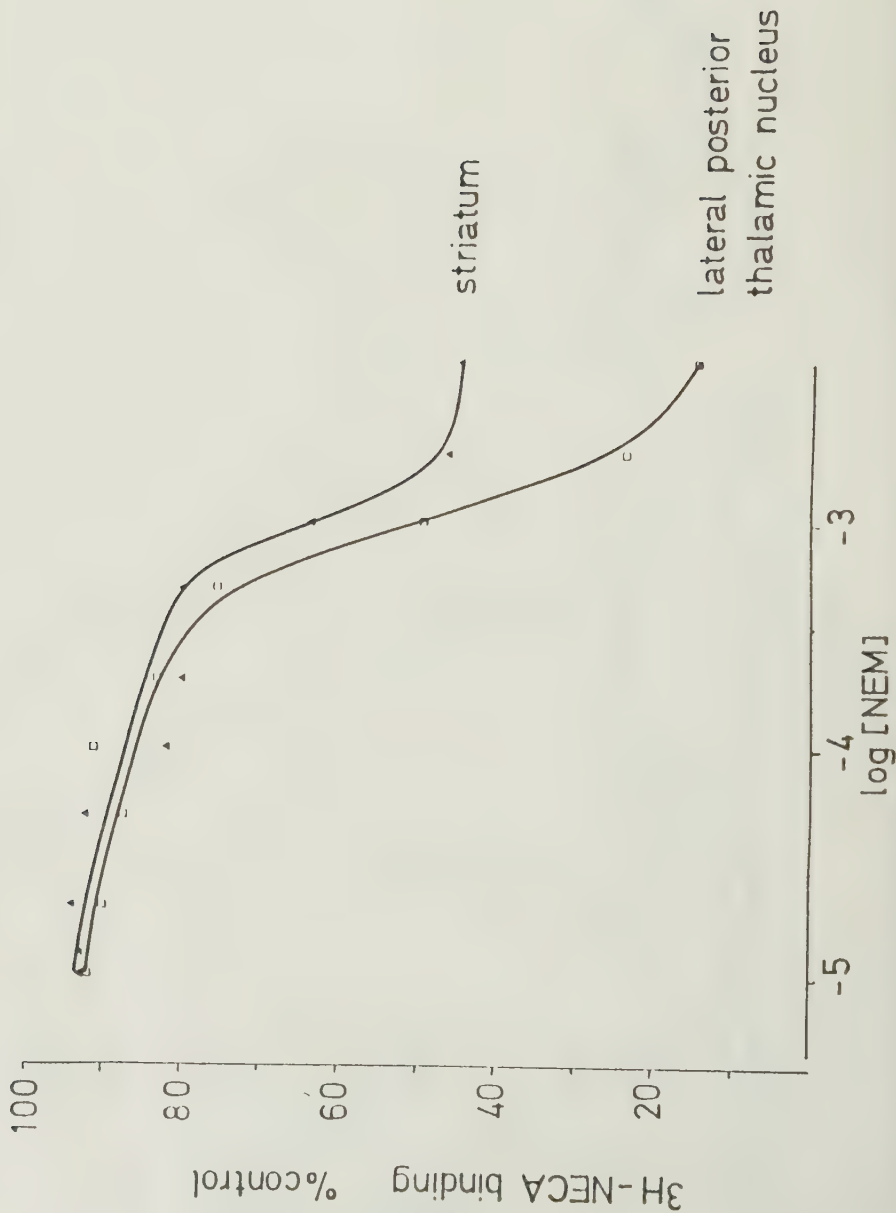
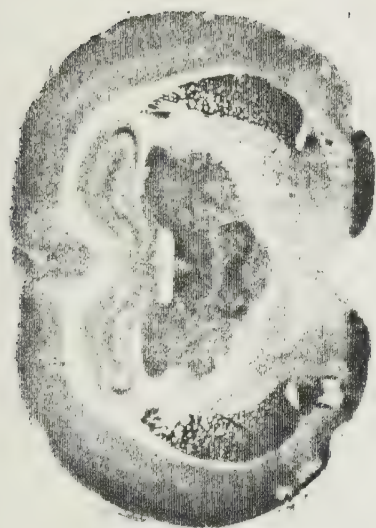


Abb. 17



[³H]-NECA-Bindung (in Anwesenheit von 10⁻⁶M R-PIA)
Vorbehandlung mit NEM (20°C, 30')

Quantitative Autoradiographie

Tabelle 12

Konzentration NEM [mM]	0,1	0,5	0,7	1	1,5	2	3	5	7	10
Striatum (Bregma -3,8mm)	100,0	100,0	90,6	78,8	55,9	55,7	61,1	34,0	29,3	31,3
Striatum (Bregma +0,2mm)	99,1	88,9	90,8	83,3	81,1	48,0	51,5	31,8	25,2	20,6
Nucleus accumbens	97,9	86,1	93,5	77,9	68,9	48,4	44,8	29,6	20,0	15,2
Tuberculum olfactorium	100,4	94,5	90,7	80,2	79,0	53,9	58,7	28,0	20,2	15,6
Stratum lucidum CA3	107,1	107,3	61,9	71,6	45,0	53,0	53,0	19,2	16,7	13,4
Cortex Area 2a 4. Schicht	95,0	82,6	85,5	64,3	66,4	32,6	31,0	13,0	3,7	2,4
Cortex Area 4l 4. Schicht	105,6	108,4	62,2	69,7	39,6	46,9	38,1	14,9	11,3	10,7
Nucleus thalamicus lat. post.	103,0	93,5	71,0	62,7	31,9	31,6	26,1	11,0	10,4	6,4
Stratum oriens CA1	110,0	95,1	70,0	59,0	41,9	4,3	38,4	6,0	--	7,5
Gyrus dentatus Stratum moleculare	102,3	89,6	57,0	73,0	32,0	35,9	28,1	8,6	12,5	10,6

Abb. 18

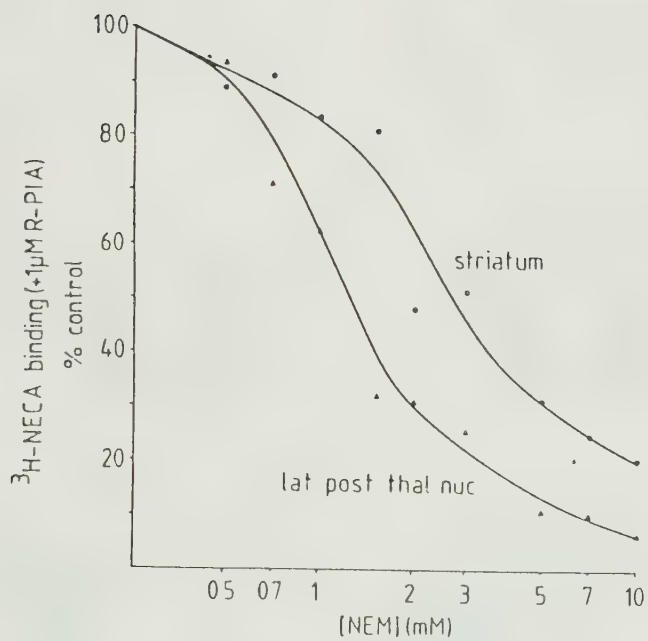


Abb. 19



4. Diskussion

Die durch quantitative Autoradiographie erhaltenen Ergebnisse der Bindungsstudien mit [^3H]-CHA zeigen, daß sämtliche untersuchten Regionen des Rattenhirns bezüglich der [^3H]-CHA-Bindung Eigenschaften besitzen, die auf das Vorhandensein des A_1 -Adenosin-Rezeptors deuten. Die Untersuchung der Bindungskinetik durch Hill-Analyse erbrachte keinen Hinweis auf eine Heterogenität von Hochaffinitätsbindungsstellen. Der Effekt des Adenosintriphosphat-Derivats AppNHp auf die [^3H]-CHA-Bindung scheint uneinheitlich zu sein. Es ist bekannt, daß AppNHp in Studien mit Membranfraktionen ^{12,17} die [^3H]-CHA-Bindung um bis zu 80% inhibieren kann, während die Bindung des Adenosinantagonisten [^3H]-Diathylphenylxanthin in Anwesenheit von AppNHp erhöht werden konnte. Die durch quantitative Autoradiographie erhaltenen Ergebnisse (Tab.5) bestätigen die Vermutung, daß ATP und Analoga ihre Wirkung nicht über eine simple Agonisten- oder Antagonistenrolle vermitteln. Da sich die Wirkung der Adennukleotide zusätzlich zu der der Guaninnukleotide entfaltet ¹⁷, kann vermutet werden, daß das Guaninnukleotid-Bindungsprotein N, nicht der Ort der AppNHp-Wirkung ist.

Im Gegensatz zur Wirkung von AppNHp erniedrigt das Guanosintriphosphat-Derivat GppNHp die [^3H]-CHA-Bindung eindeutig und in allen durch quantitative Autoradiographie untersuchten Regionen. Zusammenfassend legen die über die [^3H]-CHA-Bindung erhaltenen Ergebnisse es nahe, daß sämtliche durch den A_1 -Rezeptor vermittelten Ereignisse, ob praesynaptisch ^{22,26} oder postsynaptisch ^{20,17}, über ähnliche Typen von Ligand-Erkennungsstellen verlaufen. Eine Assoziation des A_1 -Rezeptors mit dem Guaninnukleotid-Bindungsprotein N, kann für alle Hirnregionen angenommen werden.

Die Bindungsstudien mit [^3H]-NECA weisen auf die Bindung an verschiedene Bindungsstellen hin, was global gut an den atypischen Hill-Zahlen der Experimente mit quantitativer Autoradiographie abgelesen werden kann. Die rasche Verdrängung eines Teiles der [^3H]-NECA-Bindung durch

nanomolare Konzentrationen an R-PIA sowohl in Membranfraktionen als auch in Kryostatschnitten deutet auf die Bindung an den A_1 -Rezeptor. Die non- A_1 -Bindungsstellen erwiesen sich als heterogen: in Membranfraktionen von Cortex, Cerebellum und Hippocampus gab es eine nicht R-PIA-sensitive Komponente ähnlich wie das für Bindungsstellen an Thrombocyten beobachtet wurde ⁴⁴. Im Striatum war R-PIA dagegen in der Lage [3H]-NECA weiter zu verdrängen - bei gleichzeitiger höherer Verdrängungsfähigkeit von "kaltem" NECA -, was in Einklang mit der Existenz eines A_2 -Rezeptors im Striatum zu bringen ist ¹⁰⁰. Daß die non- A_1 -Bindungskomponente jedoch auch im Striatum nicht vollständig durch R-PIA eliminiert werden konnte, deutet auf das Vorhandensein einer dritten Kategorie von Bindungsstellen hin. Neben dem A_1 -Rezeptor, dem von Yeung und Green ¹⁰⁰ beschriebenen A_2 -Rezeptor kann somit für das Striatum eine weitere non- A_1 -Bindungsstelle postuliert werden, die sich durch R-PIA-Unempfindlichkeit auszeichnet. Die anhand der Membranfraktionsstudien erhaltenen Ergebnisse konnten durch quantitative Autoradiographie bestätigt werden. Der zusätzlich zum Ausschluß weiterer Heterogenität unternommene [3H]-NECA-Bindungsversuch bei 0°C zeigte für "kaltes" NECA keinerlei Unterschied zwischen 0°C und Raumtemperatur. Die Inhibition der Verdrängung durch R-PIA bei 0°C konnte dadurch erklärt werden, daß R-PIA und NECA als unterschiedlich substituierte Adenosinderivate (R-PIA ist in der N⁶-Position substituiert ¹⁷²) in ihrer Temperaturabhängigkeit differieren.

Die Charakterisierung der verschiedenen [3H]-NECA-Bindungsstellen ist sowohl - wie oben beschrieben - durch die unterschiedlichen pharmakologischen Eigenschaften von R-PIA und NECA möglich als auch durch die Vorbehandlung mit alkylierenden Substanzen wie N-Athylmaleimid (NEM) ¹⁰⁰. Einführende Versuche mit Cortex-Membranfraktionen zeigten die Effektivität von NEM und PCMB und verdeutlichten die Konzentrations-, Temperatur- und Zeit-Abhängigkeit der Vorbehandlungswirkung. Die quantitative Autoradiographie von Kryostatschnitten zeigte die Wirkung von NEM auf die A_1 - und die nicht R-PIA-sensitive Bindungs-

komponente. Die [^3H]-NECA-Bindungsaktivität, die nach NEM-Vorbehandlung verblieb, hatte die pharmakologischen Eigenschaften des A_2 -Adenosinrezeptors: die Affinität war niedriger als für eine A_1 -Bindungsstelle und NECA war im Verdrängen von [^3H]-NECA stärker als R-PIA. Studien mit und ohne zusätzliche Beigabe von R-PIA zeigten drei Typen von [^3H]-NECA-Bindungsstellen: der durch R-PIA leicht zu eliminierende A_1 -Typ (z.B. im Stratum radiatum des Hippocampus), der R-PIA-unempfindliche, aber NEM-sensitive non- A_1 -Typ (z.B. im Cortex und im Thalamus) sowie die durch NEM weniger beeinflussbaren Bindungsstellen vom A_2 -Typ.

Die physiologische Bedeutung der NEM-sensitiven non- A_1 -Bindungsstellen im Rattenhirn erscheint unklar. Die diskutierbare Parallele zu den R-PIA-unempfindlichen Thrombocytenbindungsstellen²² kann nur schwer gezogen werden, da letztere NEM-unempfindlich sind. Deutlich erscheint lediglich, daß es sich bei den NEM-sensitiven non- A_1 -Bindungsstellen im Rattenhirn nicht um A_2 -Rezeptoren hoher oder niedriger Affinität handeln kann, da diese durch R-PIA in mikromolaren Konzentrationen beeinflussbar sind.

Als A_2 -Adenosinrezeptor kann dagegen der NEM-unempfindliche Typ von [^3H]-NECA-Bindungsstellen interpretiert werden, der im Rattenhirn eine hochspezifische Verteilung besitzt und ausschließlich in Striatum, Nucleus accumbens und Tuberculum olfactorium lokalisiert ist. Auch die Beobachtung, daß diese Regionen reich an Adenosin-sensitiver Adenylatcyclase sind^{22,23}, unterstützt die Annahme, daß es sich bei den nicht-NEM-sensitiven Bindungsstellen um physiologische A_2 -Rezeptoren vom Hochaffinitätstyp handelt²⁴.

Bemerkenswert erscheint, daß die drei Regionen in denen der A_2 -Rezeptor gefunden werden konnte, eine im Hirn einzigartige zelluläre Architektur besitzen^{25,26}. Im cholinergen System finden sich hier die cholinergen Interneurone; im dopaminergen System sind Striatum, Nucleus accumbens und Tuberculum olfactorium die Regionen mit der höchsten Gesamtbindung für [^3H]-Spiroperidol²⁷. Durch digitale Subtraktionsautoradiographie konnte

gezeigt werden, daß der selektive D_2 -Dopaminantagonist (-)-Sulpirid vor allem in Striatum, Nucleus accumbens und Tuberculum olfactorium [3H]-Spiroperidol verdrängt, was für eine spezifische Verteilung der D_2 -Bindungsstellen in diesen Regionen spricht ¹. Im Striatum endet mit seinen Projektionen der in der Ratte mit A9 bezeichnete nigro-striatale Dopamintrakt und zwar an dopaminrezeptorhaltigen cholinergen Interneuronen ². Nucleus accumbens und Tuberculum olfactorium sind gemeinsam mit dem basalen Kern der Stria terminalis ³ Endpunkt des in der Ratte mit A10 bezeichneten mesolimbischen Dopamintrakts, dem im Rahmen der Dopaminhypothese der Schizophrenie ^{4,5} eine besondere Bedeutung zukommt. Bei post-mortem-Untersuchungen an Gehirnen schizophrener Patienten konnte eine Erhöhung der maximalen Bindungskapazität von [3H]-Spiperon in Nucleus caudatus und Nucleus accumbens festgestellt werden ⁶. Umstritten ist, ob diese Erhöhung auf mit Neuroleptika behandelte Patienten beschränkt bleibt ^{7,8}. Die heute in der Klinik verwendeten Neuroleptika wirken auf das A9- und A10-Dopaminsystem: während dem A10-System die Vermittlung der antipsychotischen Wirkung zugesprochen wird, wird das A9-System für die extrapyramidal-motorischen Nebenwirkungen verantwortlich gemacht ⁹. Das geringere Potential einiger Neuroleptika wie Clozapin extrapyramidal-motorische Nebenwirkungen hervorzurufen wird dabei mit der spezifischen Unfähigkeit dieser Pharmaka in Verbindung gebracht das A9-Dopaminsystem zu inaktivieren ^{10,11}. Ausgehend von der Lokalisationsübereinstimmung zwischen dem Hochaffinitäts- A_2 -Adenosinrezeptor und den A9- und A10-Dopaminterminalen könnten die in den Exkursen zum Thema Methylxanthine (1.6.1.) und Lesch-Nyhan-Syndrom (1.6.2.) dargestellten Erkenntnisse eine neue Bedeutung gewinnen.

Die These von Green et al. ¹², daß Adenosin im Striatum dopaminerge Funktionen moduliert, basiert auf der Beobachtung, daß Ratten nach links rotieren, wenn ihnen bei subcutaner Gabe von Apomorphin NECA in den linken Nucleus caudatus injiziert wird. Der experimentelle Ansatz von Green et al. ¹², ergibt sich aus verschiedenen schwedischen Untersuchungen der Siebzigerjahre, die

befanden, daß Methylxanthine den Dopamin-Turnover herabsetzen ²⁴, Coffein bei Ratten die durch systemische L-DOPA-Gabe ¹⁰ oder durch Dopamininjektion in den Nucleus accumbens induzierte ⁵ Motilitätssteigerung potenziert, sowie die durch Coffein vermittelte Motilitätspotenzierung auch nach Läsionsexperimenten am überempfindlichen Dopaminrezeptor des Striatum zu beobachten ist ²⁵. Zur Zeit ihrer Publikation wurden diese Ergebnisse durch die Inhibition der Phosphodiesterase erklärt, Green et al. ²⁶ konnten ihre Beobachtungen durch die Interaktion mit dem A₂-Adenosinrezeptor im Striatum erklären; aufgrund der hochspezifischen Verteilung des Hochaffinitäts-A₂-Rezeptors in Striatum, Nucleus accumbens und Tuberculum olfactorium, die in dieser Arbeit beschrieben wird, kann darüber hinaus die Vermutung geäußert werden, daß die Modulation dopaminerger Funktionen sowohl im A₉ als auch im A₁₀-System eine wichtige Aufgabe des A₂-Adenosinrezeptors darstellt. Die Möglichkeit, daß eine veränderte Adenosin-Dopamin-Interaktion ein wichtiger, verschiedener Funktionsstörungen der Basalganglien zugrundeliegender Faktor sein könnte, erscheint weiterer Überprüfung würdig.

5. Zusammenfassung

Mittels quantitativer Autoradiographie wurde das Bindungsverhalten der Adenosinrezeptorliganden [^3H]-Cyclohexyladenosin ([^3H]-CHA) und [^3H]-N-Athylcarboxamidoadenosin ([^3H]-NECA) im Rattenhirn untersucht.

In der Bindung von [^3H]-CHA konnte durch Scatchard-Analyse kein Unterschied der Dissoziationskonstanten in den einzelnen Hirnregionen festgestellt werden. Die meiste Bindung fand sich im Kleinhirn (stratum moleculare) und im Hippocampus (stratum radiatum der CA₁-Region). Es konnte gezeigt werden, daß die [^3H]-CHA-Bindungsstellen überall im Gehirn die pharmakologischen Eigenschaften von A₁-Rezeptoren besitzen und daß diese Bindung durch das Guanosintriphosphat GppNHp abgeschwächt wird, was für eine Bindung des A₁-Rezeptors an das Guaninnukleotid-Bindungsprotein N₁ in allen Hirnregionen spricht.

Die Bindungsstellen für [^3H]-NECA konnten in drei Gruppen eingeteilt werden: die Bindungsstellen vom A₁-Typ, die durch R-Phenylisopropyladenosin nicht beeinflussbaren jedoch N-Athylmaleimid empfindlichen non-A₁-Bindungsstellen (vor allem im Cortex und Thalamus) und die N-Athylmaleimid unempfindlichen Bindungsstellen, die A₂-Kriterien erfüllen und innerhalb des Rattenhirns in auffälliger Weise in Striatum, Tuberculum olfactorium und Nucleus accumbens lokalisiert sind. Durch die Vorbehandlung mit N-Athylmaleimid konnten A₂-Adenosinrezeptoren erstmals selektiv sichtbar gemacht werden.

6. Schrifttumsverzeichnis

1. Adams, R.D. und Victor, M.
(1981) Principles of Neurology, Mac Graw Hill Inc., New York, 690
2. Alexander, G.M., Schwartzman, R.J., Bell, R.D., Yu, J. und Renthal, A.
(1981) Brain Res. 223,59-67
3. Alexander, S. und Reddington, M.
(1986) Pflügers Archiv 407(suppl.1),S28
4. Altar, C.A., Joyce, J.N. und Marshall, J.F.
(1986) Quantitative Receptor Autoradiography, Hrsg. Boast, C.A. et al., Alan R. Liss, Inc., New York, 53-78
5. Andén, N.E. und Jackson, D.M.
(1975) J.Pharm.Pharmac. 27,666-670
6. Asano, T. und Spector, S.
(1979) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 76,977-981
7. Barberis, C., Minn, A. und Gayet, J.
(1981) J.Neurochem. 36,347-354
8. Barns, R.J. und Keech, D.B.
(1968) Biochim.Biophys.Acta 159,514-526
9. Bender, A.S., Wu, P.H. und Phillis, J.W.
(1980) J.Neurochem. 35,629-640
10. Bennett Jr., J.P.
(1978) Neurotransmitter Receptor Binding, Hrsg. Yamamura, H.I. et al., Raven, New York, 57-90
11. Berkowitz, B.A., Spector, S. und Pool, W.
(1971) Eur.J.Pharmacol. 16,315-321
12. Berne, R.M., Rubio, R. und Curnish, R.R.
(1974) Circ.Res. 35,262-271
13. Boulenger, J.P., Patel, J., Post, R.M., Parma, A.M. und Marangos, P.J.
(1983) Life Sci. 32,1135-1142
14. Bourne, G.H. und Golarz, M.N.
(1959) Nature 183,1741-1743
15. Brezinova, V.
(1974) Br.J.Clin.Pharmac. 1,203-208
16. Brezinova, V., Oswald, I. und Loudon, J.
(1975) Br.J.Psych. 126,439-445

17. Brownstein, M.J.
(1981) Basic Neurochemistry, Hrsg. Siegel, G.J.
et al., Little, Brown and Co., Boston, 219-232
18. Bruns, R.F., Daly, J.W. und Snyder, S.H.
(1980) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 77,5547-5551
19. Burnstock, G.
(1981) Lancet i,1397-1399
20. Catel, W. und Schmidt, J.
(1959) Dtsch.Med.Wochenschr. 84,2145
21. Cautrecasas, P. und Hollenberg, M.D.
(1976) Advances in Protein Chemistry,
Hrsg. Anfinsen, C.B. et al., Academic Press,
New York, 251-451
22. Chiodo, L.A. und Bunney, B.S.
(1983) J.Neurosci. 3/8,1607-1619
23. Cobbin, L.B., Einstein, R. und Maguire, M.H.
(1974) Br.J.Pharmacol. 50,25-33
24. Corrodi, H., Fuxe, K. und Jonsson, G.
(1972) J.Pharm.Pharmac. 24,155-158
25. Creese, I.
(1986) The Receptors, Volume IV, Hrsg. Conn, P.M.,
Academic Press, Orlando, 171-212
26. Cusack, N.J. und Hourani, S.M.O.
(1981) Br.J.Pharmacol. 72,443-447
27. Daly, J.W.
(1982) J.Med.Chem. 25/3,197-207
28. Daly, J.W., Butts-Lamb, P. und Padgett, W.
(1983) Cell.Mol.Neurobiol. 3,69-80
29. Dar, M.S., Mustafa, S.J. und Wooles, W.R.
(1983) Life Sci. 33,1363-1374
30. De Freitas, B. und Schwartz, G.
(1979) Am.J.Psychiat. 136,1337-1338
31. Dehio, H.
(1887) Untersuchungen über den Einfluß des Coffeins
und Thees auf die Dauer einfacher psychischer
Vorgänge, Dissertation, Dorpat
32. Delay, J. und Deniker, P.
(1968) Handbook of Clinical Neurology, Hrsg.
Vinken, P.J. und Bruyn G.W., North Holland,
Amsterdam, Band 6,248-266
33. Dolphin, A.C. und Archer, E.R.
(1983) Neurosci.Lett. 43,49-54

34. Drury, A.N. und Szent-György, A.
(1929) J.Physiol. (Lond.) 68,213-217
35. Dunwiddie, T.V.
(1985) Internat.Rev.Neurobiol. 27,63-139
36. Dunwiddie, T.V. und Fredholm, B.B.
(1984) Naunyn-Schm.Arch.Pharmacol. 326,294-301
37. Dunwiddie, T.V. und Worth, T.
(1982) J.Pharmacol.exp.Ther. 220,70-76
38. Engel, W.K. und Hawley, R.J.
(1977) J.Neurol. 215,161-168
39. Fain, J.N. und Malbon, C.C.
(1979) Mol.Cell.Biochem. 25,143-169
40. Fox, I.H. und Kelley, W.N.
(1978) Ann.Rev.Biochem. 47,655-686
41. Fras, I.
(1974) Am.J.Psychiat. 131,228-229
42. Fredholm, B.B.
(1977) Med.Biol. 55,262-267
43. Fredholm, B.B., Brodin, K. und Strandberg, K.
(1979) Acta Pharmacol.Toxicol. 45,336
44. Freyhan, F.A.
(1959) Am.J.Psychiat. 115,577-585
45. Fuxe, K. und Ungerstedt, U.
(1974) Med.Biol. 52,48-54
46. Gavish, M., Goodman, R.R. und Snyder, S.H.
(1982) Science 215,1633-1635
47. Gilbert, R.M.
(1976) Research Advances in Alcohol and Drug Problems, Hrsg. Gibbins, R.J. et al., Wiley, New York, Band 3,49-176
48. Glader, B.E., Backer, K. und Diamond, L.K.
(1983) New Engl.J.Med. 309,1486-1490
49. Goodman, R.R., Cooper, M.J., Gavish, M. und Snyder, S.H.
(1982) Mol.Pharmacol. 329-335
50. Goodman, R.R., Kuhar, M.J., Hester, L. und Snyder, S.H.
(1983) Science 220,967-969
51. Goodman, R.R. und Snyder, S.H.
(1982) J.Neurosci. 2,1230-1241

87. Londos, C. und Wolff, J.
(1977) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 74,5482-5486
88. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und Randall, R.J.
(1951) J.Biol.Chem. 193,265-275
89. Lutz, E.G.
(1978) J.Clin.Psychiat. 39,691-698
90. Mackay, A.V.P., Bird, E.D., Spokes, E.G., Rossor, M., Iversen, L.L., Creese, I. und Snyder, S.H.
(1980) Lancet 2,915-916
91. Madras, B.K.
(1984) Handbook of Neurochemistry,
Hrsg. Lajtha, A., Plenum, New York, 2.Auflage,
Band 6, 71-106
92. Mah, H.D. und Daly, J.W.
(1976) Pharmacol.Res.Comm. 8,65-79
93. Marangos, P.J., Patel, J., Martino, A.M., Dilli, M. und Boulenger, J.P.
(1983) J.Neurochem. 41,367-374
94. Maitre, M., Ciesielski, L., Lehmann, A., Kempf, E. und Mandel, P.
(1974) Biochem.Pharmacol. 23,2807-2816
95. Marangos, P.J., Paul, S.M., Parma, A.M., Goodwin, F.K., Syapin, P. und Skolnick, P.
(1979) Life Sci. 24,851-858
96. McGeer, P.L., Grewaal, D.S. und McGeer, E.G.
(1974) Brain Res. 80,211-217
97. McKenzie, S.G., Frew, R. und Baer, H.P.
(1977) Eur.J.Pharmacol. 41,183-192
98. McManamy, M.C. und Schube, P.G.
(1936) New Engl.J.Med. 215,616-620
99. Meltzer, H.Y. und Stahl, S.M.
(1976) Schizophrenia Bulletin, 2/1,19-76
100. Mikkelsen, E.J.
(1978) J.Clin.Psychiat. 39,732-736
101. Morpurgo, C.
(1962) Arch.Int.Pharmacodyn. 137,84-90
102. Mustafa, S.J.
(1979) Biochem.Pharmacol. 28,2617-2624
103. Nagy, A.
(1986) Cellular Biology of Ectoenzymes, Hrsg.
Kreutzberg, G.W. et al., Springer, Berlin, 49-59

104. Neerunjun, J.S., Allsop, J. und Dubowitz, V.
(1978) *Cl. Sci. Mol. Med.* 55, 573-576
105. Newby, A.C.
(1984) *TIBS* 2, 42-44
106. Nyhan, W.L.
(1973) *Ann. Rev. Med.* 24, 41-61
107. Okwuasaba, F.K. und Cook, M.A.
(1980) *J. Pharmac. exp. Ther.* 215, 704-709
108. Paalzow, G. und Paalzow, L.
(1973) *Acta Pharm. Tox.* 32, 22-32
109. Penney, J.B., Frey, K. und Young, A.B.
(1981) *Europ. J. Pharmacol.* 72, 421-422
110. Petrack, B., Czernik, A.J., Ansell, J. und Cassidy, J.
(1981) *Life Sci.* 28, 2611-2615
111. Petrides, P.E.
(1979) *Physiologische Chemie*, Hrsg. Löffler, G. et al., Springer, Berlin, 407-468
112. Phillis, J.W.
(1984) *Prog. Neuropsychopharm. Biol. Psych.* 8, 495-502
113. Phillis, J.W., Kostopoulos, G.K. und Limacher, J.J.
(1977) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 52, 1226-1229
114. Phillis, J.W. und Wu, P.H.
(1981) *Prog. Neurobiol.* 16, 187-239
115. Phillis, J.W. und Wu, P.H.
(1983) *Physiology and Pharmacology of Adenosine Derivatives*, Hrsg. Daly, J.W. et al., Raven, New York, 219-236
116. Pons, F., Bruns, R.F. und Daly, J.W.
(1980) *J. Neurochem.* 34, 1319-1323
117. Prasad, R.N., Bariana, D.S., Fung, A., Savic, M. und Tietje, K.
(1980) *J. Med. Chem.* 23, 313-319
118. Premont, J., Tassin, J., Blanc, G. und Bockaert, J.
(1979) *Physiological and Regulatory Functions of Adenosine and Adenine Nucleotides*, Hrsg. Baer, H.P. und Drummond, G.I., Raven, New York, 259-269
119. Proctor, W.R. und Dunwiddie, T.V.
(1984) *Science* 224, 519-521
120. Psychoyos, S., Ford, C.J. und Philipps, M.A.
(1982) *Biochem. Pharmacol.* 31, 1441-1442

121. Pull, I. und McIlwain, H.
(1977) *Neurochem. Res.* 2,203-216
122. Radulovacki, M., Virus, R.M.,
Djuricic-Nedelson, M. und Green R.D.
(1984) *J. Pharmacol. exp. Ther.* 228,268-274
123. Rainbow, T.C., Biegon, A. und Berck, D.J.
(1984) *J. Neurosci. Meth.* 11,231-241
124. Rall, T.W.
(1980) *The Pharmacological Basis of Therapeutics*,
Hrsg. Goodman Gilman, A. et al., Macmillan,
New York, 6. Auflage, 592-607
125. Reddington, M.
(1985) *Adenosine: Receptors and Modulation of
Cell Function*, Hrsg. Stefanovich, V. et al.,
IRL Press, Oxford, 181-188
126. Reddington, M.
(1986) *Pflügers Archiv* 407(suppl.1),S3
127. Reddington, M., Alexander, S.P., Erfurth, A.,
Lee, K.S. und Kreutzberg, G.W.
(1987) *Topics and Perspectives in Adenosine
Research*, Hrsg. Gerlach, E. und Becker, B.F.,
Springer Verlag, Heidelberg, 49-58
128. Reddington, M., Lee, K.S. und Schubert, P.
(1982) *Neurosci. Lett.* 28,275-279
129. Reddington, M., Lee, K.S., Schubert, P. und
Kreutzberg, G.W.
(1983) *CNS Receptors*, Hrsg. Mandel, P. und
De Feudis, F.V. Raven, New York, 465-476
130. Reddington, M. und Pusch, R.
(1983) *J. Neurochem.* 40,285-290
131. Ribeiro, J.A. und Sebastiao, A.M.
(1986) *Progress in Neurobiology*, Band26,179-209
132. Ritchie, J.M.
(1975) *The Pharmacological Basis of Therapeutics*,
Hrsg. Goodman, L.S. und Gilman, A., Macmillan,
New York, 367-378
133. Saletu, B., Allen, M. und Itil, T.M.
(1974) *Pharmakopsychiat.* 254,307-321
134. Sattin, A.
(1971) *J. Neurochem.* 18,1087-1096
135. Sattin, A.
(1981) *Chemisms of the Brain*, Hrsg. Rodnight, R.
et al., Churchill-Livingstone, Edinburgh, 265-275

136. Sattin, A., Stone, T.W. und Taylor, D.A.
(1978) Life Sci. 23,2621-2626
137. Sattin, A. und Rall, T.W.
(1970) Mol.Pharmacol. 6,13-23
138. Schnackenberg, R.C.
(1973) Am.J.Psychiat. 130,796-798
139. Schubert, P. und Kreutzberg, G.W.
(1987) Topics and Perspectives in Adenosine
Research, Hrsg. Gerlach, E. und Becker, B.F.,
Springer Verlag, Heidelberg, 521-532
140. Schubert, P. und Mitzdorf, U.
(1979) Brain Res. 172,186-190
141. Schütz, W., Kraupp, O., Bacher, S. und Raberger, G.
(1983) Basic Res.Cardiol. 78,679-684
142. Schwabe, U., Lenschow, V., Ukena, D. Ferry, D.R.
und Glossmann, H.
(1982) Naunyn-Schm.Arch.Pharmacol. 321,84-87
143. Schwabe, U. und Trost, T.
(1980) Naunyn-Schm.Arch.Pharmacol. 313,179-187
144. Seeman, P.
(1980) Pharmacol.Rev. 32,229-313
145. Segal, M.
(1982) Eur.J.Pharmacol. 73,193-199
146. Segel, I.H.
(1975) Enzyme Kinetics, Wiley, New York, 360-375
147. Siggins, G. und Schubert, P.
(1981) Neurosci.Lett. 23,55-60
148. Skolnick, P., Marangos, P.J., Goodwin, F.K.,
Edward, S.M. und Paul, S.
(1978) Life Sci. 23,1473-1480
149. Snyder, S.H.
(1981) Trends Neurosci. 4,242-244
150. Snyder, S.H.
(1985) Ann.Rev.Neurosci., 8,103-124
151. Snyder, S.H., Katims, J.J., Annau, Z., Bruns, R.F.
und Daly, J.W.
(1981) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 78,3260-3264
152. Solomons, C.C., Ringel, S.P., Nwuke, E.I. und
Suga, H.
(1977) Nature 268,55-56
153. Spielman, W.S. und Thompson, C.I.
(1982) Am.J.Physiol. 242,F423-F435

154. Stern, J.A. und McDonald, D.G.
(1965) *Ann. Rev. Psychol.* 16, 225-264
155. Stiles, G.L.
(1985) *J. Biol. Chem.* 260, 6728-6732
156. Stiles, G.L., Daly, D.T. und Olsson, R.A.
(1985) *J. Biol. Chem.* 260, 10806-10811
157. Stillner, V., Popkin, M.K. und Pierce, C.M.
(1978) *Am. J. Psychiat.* 135, 855-856
158. Stone, T.W.
(1981) *Neuroscience* 6/4, 523-555
159. Stone, T.W. und Perkins, M.N.
(1979) *Nature (Lond.)* 281, 227-228
160. Stone, T.W. und Taylor, D.A.
(1979) *Neurosci. Lett.* 11, 93-97
161. Strömberg, U. und Waldeck, B.
(1973) *J. Neur. Transmiss.* 34, 241-252
162. Ten Bruggencate, G., Steinberg, R., Stöckle, H.
und Nicholson, C.
(1978) *Iontophoresis and Transmitter Mechanisms in
the Mammalian Central Nervous System*,
Hrsg. Ryall, R.W. und Kelly, J.S., Elsevier
North Holland, Amsterdam, 412-415
163. Tetzlaff, W., Schubert, P. und Kreutzberg, G.W.
(1987) *Synaptic and extrasynaptic localisation of
adenosine binding sites in the rat hippocampus*,
Neuroscience
164. Thomson, W.H.S. und Smith, I.
(1976) *Lancet* 2, 805-806
165. Trost, T. und Stock, K.
(1977) *Naunyn-Schm. Arch. Pharmacol.* 299, 34-40
166. Ukena, D., Poeschla, E., Hüttemann, E. und
Schwabe, U.
(1984) *Naunyn-Schm. Arch. Pharmacol.* 327, 247-253
167. Ungerstedt, U.
(1971) *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 367, 1-48
168. Unnerstall, J.R., Niehoff, D.L., Kuhar, M.J. und
Palacios, J.M.
(1982) *J. Neurosci. Meth.* 6, 59-73
169. Valentine, W.N., Paglia, D.E., Tartaglia, A.P. und
Gilsanz, F.
(1977) *Science* 195, 783-785
170. Van Calker, D., Müller, M. und Hamprecht, B.
(1978) *Nature* 276, 839-841

171. Van Calker, D., Müller, M. und Hamprecht, B.
(1979) J.Neurochem. 33,999-1005
172. Vapaatalo, H., Onken, D., Neuvonen, P.J. und Westermann, E.
(1975) Arzneim.-Forsch. 25,407-410
173. Wainer, B.H., Levey, A.I., Mufson, E.J. und Mesulam, M.M.
(1984) Neurochem.Int. 6,163-182
174. White, F.J. und Wang, R.Y.
(1983) Science 221,1054-1056
175. Williams, M.
(1984) Handbook of Neurochemistry, Hrsg. Lajtha, A., Plenum, New York, 2.Auflage, Band6, 1-26
176. Williams, M.
(1984) TINS 164-168
177. Williams, M. und Risley, E.A.
(1980) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 77,6892-6896
178. Williams, M. Risley, E.A. und Huff, J.R.
(1981) Can.J.Physiol.Pharmacol. 59,897-900
179. Winn, H.R., Rubio, R. und Berne, R.M.
(1981) Am.J.Physiol. 241,H235-H242
180. Winn, H.R., Welsh, J.E., Rubio, R. und Berne, R.M.
(1980) Am.J.Physiol. 239,H636-H641
181. Winn, H.R., Welsh, J.E., Rubio, R. und Berne, R.M.
(1980) Circ.Res. 47,568-577
182. Winstead, D.K.
(1976) Am.J.Psychiat. 133,1447-1450
183. Wolberg, G., Zimmerman, T.P., Duncan, G.S., Elion, G.B. und Singer, K.H.
(1978) Biochem.Pharmacol. 27,1487-1495
184. Woo, Y.T., Manery, J.F., Riordan, J.R. und Dryden, E.E.
(1977) Life Sci. 21,861-876
185. Worku, Y., Luzio, J.P. und Newby, A.C.
(1984) FEBS 167,235-240
186. Wu, P.H. und Coffin, V.L.
(1984) Brain Res. 294,186-189
187. Yeung, S.H. und Green, R.D.
(1983) J.Biol.Chem. 258,2334-2339
188. Yeung, S.H. und Green, R.D.
(1984) Naunyn-Schm.Arch.Pharmacol. 325,218-225

189. Zimmermann, H., Dowdall, M.J. und Lane, D.A.
(1979) Neuroscience 4, 979-993

Lebenslauf

Andreas Erfurth

- 1961 am 12.März als Sohn des Dipl.Holzwirtes Theo Erfurth und seiner Ehefrau Erna Erfurth, geb. Dietz, in Hamburg geboren
- 1962-79 in Rom (der Vater ist Beamter der Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen - FAO)
- 1977-79 Musikstudium am Conservatorio di Santa Cecilia, Rom
- 1979 Abitur an der Deutschen Schule Rom
Beginn des Medizinstudiums an der Ludwig-Maximilians-Universität München
- 1979-83 Gaststudium am Richard-Strauss-Konservatorium, München
- 1980 Aufnahme in die Studienstiftung des deutschen Volkes
- 1984 Beginn der Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in Martinsried bei Prof. G.W. Kreutzberg
- 1986 Approbation
seit 1.Juli Assistent der Psychiatrischen Klinik der Universität München (Direktor: Prof. H. Hippus)

